

國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所

碩士論文

Graduate of Molecular and Cellular Biology

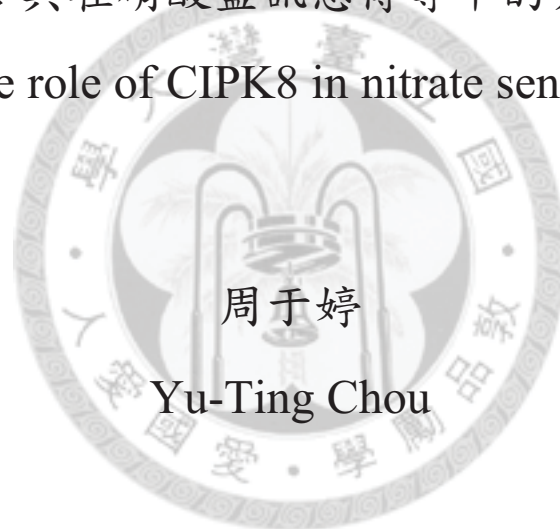
College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

CIPK8 參與在硝酸鹽訊息傳導中的分子機制

The role of CIPK8 in nitrate sensing



周于婷

Yu-Ting Chou

指導教授：蔡宜芳 博士

Advisor: Yi-Fang Tsay, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

CIPK8 參與在硝酸鹽訊息傳導中的分子機制  
The role of CIPK8 in nitrate sensing

本論文係周于婷君 (R99B43031) 在國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 07 月 27 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

蔡銘

(指導教授)

邱子玲

董桂書

系主任、所長

周子賓

## 致謝

兩年的日子裡，有歡笑成果，也有淚水挫折。

能夠在兩年前加入蔡宜芳老師的實驗室，對我而言是一件非常幸運的事。非常感謝蔡宜芳老師永遠都帶領著我向前。在我灰心的時候，不但沒有放棄我，反而給了我更多的指導和鼓勵，幫助我完成這篇論文。感謝邱子珍老師和董桂書老師對我論文的細心批改，讓論文內容更加精確完善。謝謝 N317 實驗室裡所有的學長姐：珊華學姐、雅筠學姐、博凱學長、承訓學長、珮茹學姐、慧宇學姐、國恩學長、又瑄學姐以及鳳君。你們在實驗上的教導跟分享讓我受益良多；生活上的關心跟照顧也讓我倍感溫暖，能夠和你們一起工作是很開心的事。也謝謝總是和我一起分享生活大小事的同學們，你們讓我的生活充滿歡笑。最後謝謝我的家人，謝謝你們永遠支持著我，讓我一直充滿力量跟信心。

真的很開心自己又要往人生的下一個階段前進，這段日子讓我成長了不少，感謝所有幫助過我的人。

于婷 2012.07.31

## 摘要

硝酸鹽對植物而言不僅是重要的氮源，也是不可或缺的訊息分子。植物感知土壤中的硝酸鹽後，會快速誘發和硝酸鹽相關的基因表現(nitrate primary response)，對硝酸鹽做出最有效率的利用。但對於植物細胞如何傳遞這一連串的訊號，仍所知甚少。本實驗室先前以微陣列(microarray)分析顯示磷酸激酶 CIPK23 和 CIPK8 皆參與在 CHL1 主導的硝酸鹽訊息傳遞路徑中。已知 CHL1 會感知外界硝酸鹽的濃度，透過 CIPK23 對自身第 101 胺基酸—蘇胺酸(Threonine)的磷酸化與否來改變訊號，造成下游基因不同程度的表現；此磷酸化也是 CHL1 硝酸鹽轉運能力能在高低親和性之間轉換的關鍵。本研究則針對 CIPK8 分析。酵母菌雙雜合試驗顯示 CHL1 無法和 full length CIPK8 結合，但可和 CIPK8 kinase domain 結合，推測兩者要能結合，CIPK8 可能需改變構型；為了找出能幫助 full length CIPK8 和 CHL1 相互結合的蛋白，測試 CBL1、CBL9、ANI、CIPK23、NLP7 等等，但以上蛋白仍無法幫助兩者相互結合。爪蟾卵硝酸鹽吸收活性分析顯示，CIPK8 使 CHL1 高親和性吸收能力下降 13%，且此下降在 CBL9 同時表現時更明顯，顯示 CIPK8 會影響 CHL1 T101 的磷酸化狀態。檢視 *cipk8-1* 突變株中的 nitrate response，secondary response 以及 high affinity 的 primary nitrate response 均與野生株一致，顯示 CIPK8 只參與在 low affinity primary nitrate response。深入探究 *cipk8-1* 突變株中 CHL1 T101 磷酸化的情形，發現不論高或低硝酸鹽濃度下，CHL1 T101 都無法被磷酸化，說明 CIPK8 對 CHL1 的磷酸化是 CHL1 T101 被磷酸化的先決條件。以酵母菌雙雜合試驗分析 CIPK8 在 CHL1 上的結合位置，結果顯示 CHL1 C-terminal end 和第八、第九穿膜區域間的 loop 為可能的兩個結合位。綜合以上，我們推論 CIPK8 在 CHL1 C-terminal 區域可能有兩個磷酸化位，第一位置的磷酸化可促進 T101 磷酸化，而在高硝酸鹽濃度時 CIPK8 會將第二位置磷酸化，而誘發高劑量(low affinity level)的訊息反應。我們推測 CIPK23 和 CIPK8 會共同藉由磷酸化來影響 CHL1 N-和 C-terminal 區域結構的動態，調控 CHL1 對硝酸鹽的親和性以及轉運能力。

## Abstract

Nitrate is not only an important nitrogen source for plants, but also a signaling molecule. Nitrate can rapidly induce the transcriptional expression of nitrate-related genes, such as *CHL1* and *AtNRT2.1*. This response is called the primary nitrate response. Through the previous microarray analyses, several signaling molecules such as CIPK8 and CIPK23(CBL-interacting protein kinase) were identified and found to participate in the primary nitrate response,. Previously study showed that CIPK23 can interacts with CHL1 and phosphorylates the threonine 101 of CHL1 when exposed to low nitrate concentration. By this phosphorylation, the uptake activity of CHL1 can be switched between high or low affinity, and the gene expression level of the primary nitrate response can be regulated. In this study, we investigated the role of CIPK8 in regulating the nitrate uptake and the nitrate signaling. CHL1 only interacts with the kinase domain of CIPK8; it suggested a conformation change of CIPK8 is necessary for the interaction between CHL1 and CIPK8, but all of the candidate proteins we analyzed can't help the interaction between CHL1 and CIPK8. Oocyte uptake activity assay showed that CIPK8 can reduce the high affinity nitrate uptake activity of CHL1. Q-PCR analysis showed that the *cipk8-1* mutant was only defective in low affinity phase of primary nitrate response. However, the western analysis using a CHL1 T101-P specific antibody indicated that CHL1T101 can't be phosphorylated at low nitrate concentration in *cipk8-1* mutant. The yeast-two hybrid analysis showed that both the loop between TM8-TM9 and the C-terminal end of CHL1 are the binding sites of CIPK8 kinase domain. These result suggested that CHL1 may have two CIPK8 binding sites, one is required for T101 phosphorylation; another one is response to different nitrate concentration. We speculate that CIPK8 and CIPK23 can work together to regulate the nitrate sensing ability and nitrate uptake activity of CHL1 by phosphorylation at different sites.

## 目錄

致謝 .....	I
中文摘要 .....	II
英文摘要 .....	III
第一章 前言 .....	1
第二章 實驗材料與方法 .....	7
第三章 結果 .....	20
第四章 討論 .....	28
圖表 .....	33
參考文獻 .....	51



## 圖目錄

圖一· CBL1、CBL9、CIPK23、ANI、NLP7 皆無法幫助 full length CIPK8 和 full length CHL1 相互結合.....	33
圖二· CIPK8 會降低 CHL1 的高親和性硝酸鹽轉運能力.....	34
圖三· CIPK8 T161D 會降低 CHL1 的高親和性硝酸鹽轉運能力.....	35
圖四· CHL1 蛋白在爪蟾卵中的表現量並不會因為和 CIPK8 或 CBL9 同時表現而改變.....	36
圖五· T-DNA 在 <i>cipk8-1</i> 突變株中插入的位置.....	37
圖六· CIPK8 參與在 Low-affinity primary (short-term) nitrate response 中.....	38
圖七· CIPK8 不影響 High-affinity nitrate response.....	39
圖八· 在高濃度硝酸鹽下 <i>cipk8-1</i> 突變株中的 CHL1 T101 仍為去磷酸化.....	40
圖九· 在低濃度硝酸鹽下 <i>cipk8-1</i> 突變株中 CHL1 T101 無法被磷酸化.....	41
圖十· CHL1 TM8 和 TM9 之間的 loop 以及 TM12 後的 C-terminal end 為 CIPK8 kinase domain 的兩處結合位.....	42
圖十一· CIPK8 作用機制假說.....	43
附圖一· 由 CHL1 主導的硝酸鹽訊息傳遞模式圖.....	44
附圖二· CIPKs-CBLs Interaction Model.....	45
附圖三· CHL1 只能和 CIPK8 kinase domain 相互結合.....	46
附圖四· 圖三實驗中使用的各個不同 CHL1 區域片段示意圖.....	47
附圖五· 在 <i>cipk8-1</i> 突變株中 low affinity 的 primary nitrate response 表 現量低於野生株.....	48

附圖六· CHL1 T101D / CHL1 T101A 突變株中的 primary nitrate response.....49

附圖七· PepTso 蛋白的作用機制與結構示意圖.....50





# 第一章

## 前言

### 硝酸鹽不僅是營養來源，更是一個訊號分子

隨著地球人口數持續地成長，糧食問題一直是世界關注的焦點。如何在有限的土地資源內提高作物生產的效率與作物的品質，是人類始終渴望解決的問題。而氮 ( $N_2$ , nitrogen)，是植物生長發育過程中的必需元素；植物根的生長、開花的時間以及根瘤的形成 (nodulation) 都會受到氮的影響 (Walch-Liu et al., 2005)。胺基酸、核酸，乃至二次代謝物的生合成也都需要此元素參與其組成。當植物缺氮時，會使植物的生長受到抑制，嚴重時更會有黃化凋萎的現象，施與適量的氮肥則可提高作物的產量。

一般而言，植物能夠吸收硝酸鹽 ( $NO_3^-$ , nitrate)、銨鹽 ( $NH_4^+$ , ammonium)、胍肽 (peptide) 以及尿素 (urea) 來獲取氮源，然而大部分植物仍偏好從土壤中吸收硝酸鹽作為最主要的氮源 (Crawford, 1995)。硝酸鹽由硝酸鹽轉運蛋白 (nitrate regulated transporters, NRTs) 運輸進植物細胞後，會先被硝酸鹽還原酶 (nitrate reductase, NR) 還原成亞硝酸鹽 ( $NO_2^-$ , nitrite)；再被亞硝酸鹽還原酶 (nitrite reductase, NiR) 會還原成銨鹽，而後和  $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -ketoglutarate) 在麩醯胺酸合成酶 (glutamate synthetase) 的催化下，生成麩醯胺酸 (glutamate) 進入胺基酸生合成途徑中 (Crawford, 1995)。

硝酸鹽對植物而言，除了是極為重要的氮源，同時也是調控相關同化反應 (assimilation) 的訊息分子。根據前人研究，當植物感知到土壤環境中的硝酸鹽後，

會快速地(三十分鐘至一小時)誘發一群和硝酸鹽吸收代謝有關的基因大量表現，諸如硝酸鹽轉運蛋白、硝酸鹽還原酶等等。其基因表現量呈現和外界硝酸鹽濃度成正相關，顯示植物能依此訊息產生不同程度的調控機制，以對硝酸鹽產生最大效率的利用；此反應被稱之為 primary nitrate response (Redinbaugh and Campbell, 1991 ; Tsay et al., 2011)。

### 硝酸鹽轉運系統

土壤中硝酸鹽濃度因地而異，隨天氣變動幅度大於千倍以上，濃度範圍可從 millimole 到 micromole。植物不同於動物，無法任意移動來改變生長環境，為了能有效從外界攫取硝酸鹽，植物演化出兩種不同親和性的硝酸鹽轉運系統：(1) 高親和性轉運系統 (high-affinity transport system) 負責 micromole 濃度範圍的硝酸鹽轉運。(2) 低親和性轉運系統 (low-affinity uptake transport system) 則負責 millimole 濃度範圍。研究發現，在阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中，AtNRT1 family 擁有 53 個同源蛋白 (homologue) 其中的 AtNRT1.2 已經被證實為低親和性硝酸鹽轉運蛋白 (Huang et al., 1999)，AtNRT2 family 則有 7 個同源蛋白，而 AtNRT2.1、AtNRT2.2 被發現參與在高親和性的硝酸鹽轉運過程中 (Li et al., 2007 ; Little et al., 2005)。於是科學家認為在不同的硝酸鹽濃度下，植物會利用不同的轉運蛋白進行轉運，然而根據本實驗室先前研究發現，原先被認為是低親和性轉運蛋白的 AtNRT1.1 (CHL1)，其實為一雙親和性的硝酸鹽轉運蛋白 (Liu et al., 1999)。

CHL1 雙親和性的轉換機制是藉由第 101 個胺基酸蘇胺酸 (threonine, T) 的磷酸化與否來調控。當 CHL1 的 T101 被磷酸化後，CHL1 便對硝酸鹽分子擁有高親和性 (high affinity) 的轉運能力，在爪蟾卵吸收活性實驗中，以 CHL1T101D 來模擬 CHL1T101 磷酸化態，可發現此時 CHL1 失去了低親和性轉運能力，而用 CHL1

T101A模擬去磷酸化狀態時，CHL1便為一低親和性（low affinity）的硝酸鹽轉運蛋白，只在高濃度環境下有轉運能力（Liu and Tsay, 2003）。所以利用T101的磷酸化與否，使CHL1不論是在高或低的硝酸鹽濃度下，都擁有吸收硝酸鹽的能力。這樣的轉換機制提供了植物在面對外界環境硝酸鹽濃度劇烈變換時，仍可有效地從土壤中吸收硝酸鹽類。

### 硝酸鹽的訊息傳導途徑

雖然所知甚少，但科學家也陸續發現一些可能參與在硝酸鹽訊息傳導路徑中的訊號分子們，例如 ANR1 以及 NLP7 兩個轉錄因子（transcription factor）。ANR1 會受到硝酸鹽誘導表現。在正常情況下，植物的側根會因硝酸鹽處理而增生，但在 ANR1 被抑制後，此現象便消失了。顯示 ANR1 連結了硝酸鹽和根部生長發育的關係（Zhang and Forde, 1998）。另外在 *nlp7* 突變株中，primary nitrate response 有降低的現象，顯示 NLP7 也可能是調控硝酸鹽訊號的分子之一（Casataings et al., 2009）。先前本實驗室也對阿拉伯芥進行全基因體的篩選，企圖尋找出參與在 nitrate response 中的訊息分子們。利用微陣列分析方法（microarray analysis）首先分類出同時會受硝酸鹽以及 CHL1 所影響的基因群（Hu et al., 2009）。由於 CHL1 雙親和性的轉換是靠著磷酸化來轉換；且在訊息傳導路徑中，細胞經常藉由磷酸化來活化下游的訊息分子。基於上述考量，於是針對蛋白質磷酸激酶（protein kinase）和去磷酸酶（phosphatase）優先做分析。從微陣列的結果中，本實驗室找到參與在硝酸鹽訊息傳導中的兩個磷酸激酶分別為：CIPK23 和 CIPK8，都是屬於一群名為 Calcineruin B-like (CBL) Interacting Protein Kinases (CIPKs) 中的蛋白質磷酸激酶；另外也發現一個 protein phosphatase 2C-type family 中的成員，此去磷酸酶透過和 CHL1 central loop 的結合，在硝酸鹽訊息傳導中扮演舉足輕重的角色，我們將此去磷酸酶命名為 Anakin (ANI)。

經過多年研究，我們證實了 CHL1 除了是一個硝酸鹽的雙親和性轉運蛋白，還是一個負責感知土壤中硝酸鹽濃度變化的感應器，且 CIPK23 的確參與在硝酸鹽的訊息傳導中 (Ho et al., 2009) (附圖一)。在一株為 *CHL1* null mutant 的 *chl1-5* 突變株中，primary nitrate response 大幅度降低到只剩基礎表現量，顯示植物需要 CHL1 才能使硝酸鹽訊息正常傳遞，誘發 primary nitrate response。Pro492 是 *AtNRT1* family 中高度保留的氨基酸，在 *chl1-9* 突變株中，CHL1Pro492 被 Leucine 所置換，使 CHL1 失去了轉運硝酸鹽的能力，然而檢視 *chl1-9* 突變株中 primary nitrate response 仍正常同於野生株，表示無轉運活性的 CHL1 仍可驅動下游訊號，說明了 CHL1 為一硝酸鹽感應器，且感知能力並不受制於本身的硝酸鹽轉運能力 (Ho et al., 2009)。而 CIPK23 會和 CHL1 的 N-terminal 相互結合，且 CHL1 雙親和性轉換機制中關鍵的 T101 磷酸化反應就是由 CIPK23 所催化：當植物處於低硝酸鹽濃度環境時，CIPK23 便對 CHL1 T101 進行磷酸化，使 CHL1 對硝酸鹽具有高親和性，在模擬 CHL1 磷酸化態的 CHL1 T101D 基因轉殖植物 (transgenic plant) 中，primary nitrate response 只剩下 high affinity phase；另一方面，在高濃度硝酸鹽環境下，CIPK23 不會對 CHL1 T101 進行磷酸化，在 CHL1 T101A 基因轉殖植物中的 primary nitrate response 為 low affinity 程度的表現量 (Ho et al., 2009)。證明了 T101A 會誘發高劑量的基因表現，而 T101D 則誘發低劑量的表現，而且植物是利用 CIPK23 對 CHL1T101 的磷酸化來改變對下游基因的調控，以反應土壤中不同的硝酸鹽環境。

## CIPKs-CBLs

CIPKs 顧名思義是一群會和 CBLs (calcineruin B-like proteins) 相互結合的蛋白質，結構上包含了位於 N 端的 kinase domain 以及 C 端的 regulatory domain；regulatory domain 內還有一個 NAF domain 以及 protein phosphatase interaction domain (PPI domain) (Batistic and Kudla, 2004)。過去研究已知，CIPKs 的 regulatory

domain 會對 kinase domain 造成結構上的遮蔽，使 CIPKs 不具有活性(inactive form) (附圖二)。而 CBLs (Calcium binding proteins) 是一群只存在植物體中的鈣離子感應器，可感知鈣離子濃度的變化並參與在鈣離子的訊息傳導中，CBLs 和 CIPKs NAF domain 結合造成 CIPKs 的構型改變，CIPKs 轉為活化態 (active form) 進而磷酸化下游標的蛋白，將訊息往下游傳遞 (Albrecht et al., 2001; Batistic and Kudla 2009)。

在阿拉伯芥中已發現存在 10 個 CBLs 和 26 個 CIPKs，植物利用不同 CIPKs - CBLs 複合體 (complex) 引發各自特定的訊息傳遞 (Hashimoto et al., 2012)。研究發現 CIPKs - CBLs 參與在大部分的逆境反應中，如乾旱、鹽害、寒害等等 (Xu et al., 2006; Huang et al., 2011; Tsou et al., 2012)。除了幫助植物對抗非生物逆境，CIPKs 也被證實參與在調控轉運蛋白的功能。例如在低鉀離子環境，CBL1、CBL9 會和 CIPK23 結合，活化 CIPK23 之後，磷酸化一個鉀離子轉運蛋白，AKT1，增強其吸收鉀離子的能力 (Xu et al., 2006; Li et al., 2006)。另外如 CIPK24 (SOS2) / CBL4 (SOS3) 會在高鹽濃度下增強  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  的轉運蛋白的活性，使植物對鹽害擁有較高的抗性 (Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2011)。

### **CIPK8 為 low affinity primary nitrate response 的正向調控者**

根據實驗室先前研究，CIPK8 同樣會快速地被硝酸鹽誘導表現；且在 *cipk8-1* 突變株中，降低了 primary nitrate response 在 low affinity phase 的表現量，在 high affinity phase 則沒有影響，說明 CIPK8 為 low affinity primary nitrate response 的正向調控者 (Hu et al., 2009)。本篇論文為接續之前研究，利用爪蟾卵硝酸鹽吸收實驗探討 CIPK8 如何調控 CHL1 雙親和性之間的轉換，進而影響 CHL1 的硝酸鹽轉運能力。也企圖利用酵母菌系統找到能幫助 full length CHL1 和 full length CIPK8

相互結合的蛋白；以及 CIPK8 在 CHL1 上的可能結合位。最後比較野生植株 (Wild type) 和 *cipk8-1* 突變株之間 secondary (long-term) nitrate response 以及 CHL1T101 磷酸化與否的差異，期望了解 CIPK8 在硝酸鹽訊息傳導中的分子機制。



## 第二章

### 實驗材料與方法

#### A. 酵母菌雙(三)雜合試驗

(1) 質體 (plasmid) 構築與製備：

質體列表(依載體分類)

pTMBV4 vector：pTMBV4-CHL1，pTMBV4-CHL1TM1-11

pTMBV4- TM1-10，pTMBV4-CHL1TM1-9

pTMBV4-CHL1TM1-8，pTMBV4-CHL1TM1-6

pTMBV4-CHL1 loop-TM12，pTMBV4-CHL1TM7-12

pTMBV4-CHL1TM9-12，pTMBV4-CHL1TM11-12

pTMBV4-CHL1 dloop

pTMBV4-CHL1 由何承訓學長構築，其餘為陳慧宇學姊構築。

pDL2NX vector：pDL2NX-CIPK8，pDL2NX-CIPK8 kinase

pDL2NX-NubI (positive control)

pDL2NX-NubG (negative control)

pDL2NX-CIPK8 / pDL2NX-CIPK8 kinase 由何承訓學長構築。

pDL2NX-NubI / pDL2NX-NubG 來自 DUAL membrane kit (DUAL system)。

pYES2 vector：pYES2-CBL1，pYES2-CBL9，pYES2-ANI

pYES2-CIPK23，pYES2-NLP7(5'-RWP domain)

pYES2-NLP7(RWP domain-3')

pYES2-ANI 由何承訓學長構築。

pYES2-CBL1 / pYES2-CBL9 之構築：

利用限制酶 XhoI, XbaI 將帶有 CBL1 / CBL9 cDNA 之片段從 pGEMHE-CBL1 / pGEMHE-CBL9(由侯玥如學姊構築)分別切下,加入 5  $\mu$ L 2X ligation buffer、1  $\mu$ L T4 ligase (Promega), 補水至體積 10  $\mu$ L, 置於室溫下 2 小時, 接到 0.5  $\mu$ L pGEM®-T Easy(Promega)的載體(vector)中。之後轉型(transformation)入 *E.coli* 中, 培養於塗有 80  $\mu$ L X-Gal (2 mg X-Gal/ml DMF (dimethylformamide)) 的 LB + Ampicilin (50  $\mu$ g/ml) 固體培養基中, 放置於 37°C。16 小時後, 挑白色的菌落做菌落 PCR, 確定轉型成功。將轉型成功的菌接種於 2 mL LB + Ampicilin 液體培養機中, 37°C 震盪培養 16 個鐘頭, 以 Mini-M™ Plasmid DNA Extraction System (Viogene) 抽取質體, 溶於 50  $\mu$ L 無菌水。取 5  $\mu$ L 質體加 1  $\mu$ L(10 pmole)的 T7 或 SP6 引子送核酸定序, 確認序列正確。再以限制酶 EcoRI 將 CBL1 / CBL9 cDNA 之片段切下, 接入已經先用 EcoRI 處理過的 pYES2 載體上。最後利用 T7 引子進行定序, 確認序列無誤。

pYES2- CIPK23 之構築：

過程同上, 唯接入 pYES2 載體中時以 XhoI, XbaI 作為接點。

pYES2-NLP7(5'-RWP domain) / pYES2-NLP7(RWP domain-3')之構築：

利用各 1 $\mu$ L 的 NLP7-5'-F / NLP7-RWP-R / NLP7-RWP-F / NLP7-3'-R 引子, 將兩片段從 pTeasy-full NLP7 以 5  $\mu$ L 10X High Fidelity Taq Buffer、4  $\mu$ L 2.5mM dNTP、1  $\mu$ L High Fidelity Taq mix (Fermentas) 的條件下進行連鎖聚合酶反應分離出來, 連接到 pGEM®-T Easy(Promega)的載體上, 用 HindIII, BamHI 限制酶切下接到同樣以 HindIII, BamHI 剪切過的 pYES2 載體上, 以 T7 / NLP7-5'-F / NLP7-RWP-R / NLP7-RWP-F / NLP7-3'-R 等引子定序, 確認序列正確。(引子序列請見 I. 引子列表)



將帶有上述質體之大腸桿菌株 (E.coli strain) 以含有適當抗生素的 LB 溶液，在 37°C 培養 12-16 小時，取 2mL 的菌液以桌上型離心機 6000rpm 離心 2 分鐘後，抽去上清液，以 Viogene Mini-M<sup>TM</sup> plasmid DNA extraction kit 抽取內含質體，回溶於 50μL 的無菌水中。

(2) 酵母菌株 (strain) :

DSY-1     *MATa his3delta200 trp1-901 leu2-3, 112 ade2*  
          *LYS2:(lexAop)4-HIS3 URA3:::(lexAop)8-lacZ GAL4*

NMY51    *MATa his3delta200 trp1-901 leu2-3, 112 ade2*  
          *LYS2:(lexAop)4-HIS3 ura3:::(lexAop)8-lacZ (lexAop)8-ADE2 GAL4*

來自 DUAL membrane kit (DUAL system)

(3) 酵母菌質體轉殖 (plasmid transformation) :

挑選單一菌落的酵母菌菌株以 YPD broth (1% BACTO yeast extract、1% BACTO peptone、2%glucose) 在 30°C 培養 12-16 小時，取 2mL 的菌液以桌上型離心機 6000rpm 離心 30 秒後，倒去大部份上清液。加入 1μg 的質體 DNA、2μL 10mg / mL salmon sperm DNA、20μL 1M DTT、0.5mL PLATE mixture (45%PEG4000、1M LiOAc、1M Tris-Cl (pH7.5)、0.5M EDTA)，充分混合 (vortex) 後室溫培養 12-16 小時。利用 42°C 水浴熱休克處理 10 分鐘，取 50-100 μL 菌液塗在含有不同胺基酸篩選的培養基上。30°C 培養兩天。

附註：酵母菌三雜合試驗中，pYES2 vector 使用 galactose inducible promoter，而 glucose 會對此種 promoter 產生強烈抑制效果，所以培養基中的 2% glucose 皆 2% raffinose 取代。而 X-gal 呈色試驗所用之培養基則含有 2% galactose 以及 1% raffinose。

(4) X-gal 呈色試驗：

利用牙籤挑選適當大小的酵母菌菌落，點在另一個培養基上，在 30°C 培養兩天後，利用 3mm 濾紙貼附培養基上，迅速用鑷子夾起，菌落即沾黏在濾紙上。濾紙放入培養皿用 agarose X-gal mixture (1x PBS pH7.4、0.5% (w/v) agarose、0.1mg/mL X-gal) 覆蓋，開始紀錄時間至菌落呈現藍色。

(5)  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase) 活性定量試驗：

帶有質體的酵母菌株在 5mL 培養液中，30°C 培養 12-16 小時，取 2mL 菌液加 8mL YPD，30°C 培養至 OD600 為 0.5 到 0.8 之間，並在實驗開始前先記錄此讀值。取 1.5mL 菌液，14000rpm 離心 30 秒，抽乾上清液，用 1.5mL Z-buffer(16.1g/L NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、5.5g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、0.75g/L KCl、0.246g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 洗兩次，回溶在 0.3mL 的 Z-buffer 中，只取 0.1mL 放入液態氮跟 37°C 水浴槽各 1 分鐘，並來回三次以打破細胞。而後加入 0.7mL Z-buffer(內含 2.7% 14.4M  $\beta$ -ME)以及 160 $\mu$ L 的 ONPG(4mg/mL Z-buffer)，立即開始計時。將反應溶液培養在 30°C 直至溶液呈現黃色，加入 400 $\mu$ L 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 停止反應，並記錄時間。14000rpm 離心 10 分鐘後，取 0.5mL 上清液測定 OD420 吸光值。

$\beta$ -半乳糖苷酶活性的計算公式為： $1000 \times OD420 / (\text{time}(\text{min}) \times 0.1(\text{mL}) \times OD600)$

**B. 非洲爪蟾卵 (*Xenopus laevis* oocytes) 之硝酸鹽吸收活性測定**

(1) 質體 (plasmid) 製備：

質體列表 pGEMHE-CHL1 / pGEMHE-CIPK8 / pGEMHE-CIPK8T161D  
pGEMHE-CBL9

pGEMHE-CIPK8 / pGEMHE-CIPK8T161D 為何承訓學長構築。

pGEMHE-CBL9 為侯玥如學姊構築。

將帶有上述質體之大腸桿菌株 (*E. coli* strain) 以含有適當抗生素的 LB 溶液，在 37°C 培養 12-16 小時，取 2mL 的菌液以桌上型離心機 6000rpm 離心 2 分鐘後，抽去上清液，以 Viogene Mini-M<sup>TM</sup> plasmid DNA extraction kit 抽取內含質體，回溶於 50 $\mu$ L 的無菌水中。

(2) 體外轉錄 (*in vitro* transcription) 模版製備：

取質體 40  $\mu$ L，加入 120 $\mu$ L 無菌水、20  $\mu$ L NEB 2 號 buffer (50 mM NaCl、10mM Tris-HCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT pH7.9)、20  $\mu$ L 10 mg/mL BSA 及 NheI 限制酶 2 $\mu$ L，在 37°C 下作用 12-16 小時後，取 1  $\mu$ L 電泳分析 DNA 是否被限制酶作用完全。之後以 phenol / chloroform (25:24) 純化 DNA，利用分光光度計定量，測其在紫外光吸收波長 260 nm 下的吸光值，將其稀釋至 1 $\mu$ g/ $\mu$ L。

(3) 體外轉錄 (*in vitro* transcription)：

利用 mMESSAGE mMACHIN<sup>TM</sup> 之體外轉錄組 (Ambion, Austin, Texas)，取 2  $\mu$ L 10X buffer、10  $\mu$ L 2X NTP / CAP mix、2  $\mu$ L 10X enzyme mix，加入 1  $\mu$ g 上述之 DNA 模板均勻混合後，放入 37°C 下作用 1.5 小時。之後加入 1  $\mu$ L DNaseI 混勻後在 37°C 下作用 15 分鐘，再加入 115  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O、15  $\mu$ L 4 M NH<sub>4</sub>OAc、150  $\mu$ L phenol/chloroform (25:24) 混合均勻至乳化狀，離心 (14000rpm，15 分鐘)，取上清液加入兩倍體積的 100%酒精混勻，置於-80°C 30 分鐘而後離心 (14000rpm，15 分鐘)，以 70%、95%酒精清洗沉澱物。待乾，溶解於適量的 DEPC-H<sub>2</sub>O 使 cRNA 濃度達到 4  $\mu$ g/ $\mu$ L。

(4) 非洲爪蟾卵之製備：

(a) 蛙卵之取得：

雌爪蟾放入碎冰中 30-40 分鐘使其昏迷，取出後，將肚子朝上放置於

冰上，用無塵紙在肛門向上 1-2 公分的左右兩側處將非洲爪蟾的表皮層擦乾，用消毒過的手術剪刀選擇一處橫向剪開一 1 公分的表皮開口，在將其內部肌肉層剪開一 1 公分的開口，用鈍端的手術用鑷子將非洲爪蟾的卵巢取出，置於 ND-96 不含  $\text{CaCl}_2$  的緩衝溶液中 ( $\text{NaCl}$  96 mM、 $\text{KCl}$  2 mM、 $\text{MgCl}_2$  2 mM、HEPES 5 mM、用  $\text{NaOH}$  調至 H7.6)，在非洲爪蟾傷口處倒入適量的林格氏液 (Ringer's solution,  $\text{NaCl}$  150 mM、 $\text{CaCl}_2$  1.8 mM、 $\text{KCl}$  2.5 mM、HEPES 10 mM、 $\text{MgCl}_2$  1 mM、用  $\text{NaOH}$  調至 pH7.4) 維持恆定，再用手術縫線分別將其肌肉層及表皮層分別進行縫合，共 3 針，每一針先打兩個單結再打一個雙結，第一個單結不可拉太緊，以免將皮膚或是肌肉扯破，最後一個雙結需拉緊，以免結鬆脫。最後將昏迷的非洲爪蟾先放置在一個桶子內，放入些許的水 (水面切勿超過鼻腔)，待其恢復清醒，再放入塑膠盆內，加入二分之一或是三分之一的逆滲透水，約每 24 小時換一次水，使其不受感染。

(b) 蛙卵之處理：

將取出的蛙卵至於培養皿中，用鑷子將卵的濾泡膜 (follicle cell membrane) 撕開，約 10 顆蛙卵撕成一小群，待將全部的蛙卵撕完後，捨去原來的緩衝液，加入含有濃度 0.8-1 mg/1mL 的 collagenase 之 ND-96 不含  $\text{CaCl}_2$  的 buffer，(因  $\text{Ca}^{2+}$  會抑制 collagenase 的作用) 緩衝液，以每分鐘 40 轉的轉速混合作用約 60 分鐘，每 15 分鐘用孔徑漸大的滴管抽吸蛙卵，以加速反應及均勻混合。反應完後在用 ND-96 緩衝液 ( $\text{NaCl}$  96 mM、 $\text{KCl}$  2 mM、 $\text{MgCl}_2$  2 mM、HEPES 5 mM、 $\text{CaCl}_2$  0.3 mM，pH7.4) 清洗數次，最後保存在加有抗生素 gentamycin (10g/L) 的 ND-96 緩衝溶液中。

(5) 非洲爪蟾卵之 cRNA 微量注射：

(a) 玻璃針之製備：

利用微管形成器 (Model p-87 Flaming/brown micropipette puller, Sutter instrument Co., Novato, CA) 將玻璃管 (Drummond Scientific Company, USA) 以參數為 heat 760, pull 130, vel 70, time 100, pressure 500 拉針程式拉針, 然後在顯微鏡底下將拉好的針管, 用剪刀剪成一直徑 (外徑) 為 1-2  $\mu\text{m}$  的缺口。

(b) 裝填 cRNA：

先在玻璃針管末端, 加入一段長約 2-2.5 公分的礦物油, 再將微量注射器 (model, Company) 從玻璃針末端插入, 將其架設固定在鐵架上, 在解剖顯微鏡下, 先吸取 1  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  以隔離礦物油與 cRNA, 再吸入欲注射的 cRNA。

(c) 注射 cRNA：

在解剖顯微鏡下, 從處理完畢的蛙卵中, 挑選出動物極與植物極完整並且具有明顯赤道環之健康蛙卵 (第 V-VI 期)。放置於黏有尼龍網之培養皿的網狀縫隙中, 使其在被注射的過程中不易晃動, 並加入適量的 ND-96 緩衝溶液, 在解剖顯微鏡下將準備好的 cRNA, 用微量注射器依序注入 50 nL 的 cRNA 溶液, 注射完畢後, 再將其放回含有 ND-96 緩衝溶液的培養皿, 並保存於 16°C 的培養箱中, 待兩天後蛋白質已表現再做分析。

(6) 非洲爪蟾蛙卵硝酸鹽吸收活性測試：

將蛙卵置於 ND-96 緩衝溶液中培養 48 小時, 使其充分表現蛋白質後, 在解剖顯微鏡下挑選仍然健康之蛙卵, 以 30 顆蛙卵為一組, 分別放入六孔盤中, 吸取出 ND-96 緩衝溶液, 在各個槽中分別加入 5mL 的 10 mM 或 250  $\mu\text{M}$  硝酸鹽溶液 ( $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  10 mM 或 250  $\mu\text{M}$ , 215 mM Mannitol, 0.3 mM

CaCl<sub>2</sub>，10mM Tris/MES 調整 pH 值至 5.5)，放置在震盪器上（40rpm），2 小時後從硝酸鹽溶液中將蛙卵用塑膠吸管吸出，用 ND-96 緩衝溶液，連續清洗蛙卵 3 次，將殘留在表面的硝酸鹽溶液洗淨，將之放入裝有鋁箔小袋的 96 盤孔中，吸乾所有水分，置於 80°C 的烘箱中兩天以烘乾水分。最後利用穩定同位素元素分析儀 ANCA-GSL20/20(PDZ, UK)分析同位素 <sup>15</sup>N 的含量。

(7) 爪蟾卵內 CHL1 蛋白表現量之偵測：

將單顆爪蟾卵裝進 1.5mL 的離心管中，加入 50μL oocyte protein extraction buffer (100mM NaCl, 20mM Tris PH7.5, 5mM EDTA, 0.1% Triton X-100)，將爪蟾卵震碎並和 extraction buffer 均勻混合，以 4°C 14000rpm 離心 3 分鐘。取 35μL 的上清液於新 1.5mL 離心管中，加入 10μL 1M DTT, 15μL 4x loading dye，混合後以 65°C 加熱十分鐘，置於冰上冷卻，取總量的 1/4 (20μL) 進行西方點墨法偵測 CHL1 蛋白質之含量。

### C. 西方墨點法

(1) 膠體電泳分析：

取 NuPAGE 10%Bis-Tris gel (invitrogen) 架設於直立式的電泳槽上，加入 NuPAGE MOPS SDS 緩衝溶液(0.05M 3-(N-morpholino) ethane sulfonic acid, 0.05M Tris, 2%SDS, 1.025mM EDTA) 為 running buffer。將蛋白質樣本加入膠體槽中，以 70 伏特電壓進行電泳十五分鐘後，再調整電壓至 110 伏特，進行電泳 110 分鐘。準備合適大小的 PVDF membrane，濾紙數張，海綿五片，轉印緩衝液 transfer buffer(4.08g/L Bicine, 5.232g/L Bis-Tris, 0.3g EDTA, 10% methanol)。將濾紙跟海綿以轉印緩衝液浸濕，依序將兩塊海綿，一張濾紙放入轉印槽內。當電泳結束後，切去 stacking gel 部分，將膠體放在轉印槽內的濾紙上，覆蓋上已先用 100% methanol 活化之 PVDF membrane，再

疊上濾紙以及三塊海綿，輕敲槽體趕走氣泡，注意接觸面不可有氣泡，並在槽體外放置些許冰塊，以避免器械過熱，最後以 40 伏特電壓通電一小時，即完成轉印。

(2) 專一性探針雜合：

將上述轉印完成的 PVDF membrane 以 blocking buffer 進行 blocking，以阻斷之後抗體的非專一性結合，將 membrane 置於 blocking buffer 中(8g NaCl，0.2g KCl，1.805g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，0.1% Tween 20) 室溫下搖晃 30 分鐘。而後以 1X PBST buffer (8g NaCl，0.2g KCl，1.805g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 清洗三遍，每次十分鐘。而後即可加入一級抗體在室溫環境下使之反應一小時，以 1X PBST buffer 清洗三遍，每次十分鐘。接著加入二級抗體 (anti-rabbit IgG，1:5000)，在室溫環境下反應 30 分鐘，再以 1X PBST buffer 清洗三遍，每次十分鐘。將 ECL<sup>TM</sup> detection kit 中的 A 和 B 溶液以相同比例混合，並將 membrane 均勻的以溶液淋濕，最後以底片(GE) 壓片成相。

附註：CHL1 專一性抗體以 1：5000 稀釋於 1X PBST buffer 中

CHL1 T101 磷酸化專一性抗體以 1：2000 稀釋於 1X PBST buffer

Tic110 專一性抗體以 1：5000 稀釋於 1X PBST buffer

#### D. 植物材料

I. 野生型 (wild type)：為阿拉伯芥 Columbia (Col-0) 生態型。

II. *chl1-5* 突變株：為阿拉伯芥 Columbia 生態品種經  $\gamma$ -ray 照射後造成 *CHL1* 基因缺失 (gene deletion) 突變株。(Tsay, 1993)

III. *cipk8-1* 突變株：篩選農桿菌轉殖到阿拉伯芥野生株 (Col-0) 所形成的 knockout 突變株。(Hu et al., 2008)

## E. 植物培養液與種植方法

### (1) 植物培養液：

#### (a) 銨鹽培養液 (ammonium succinate solution)：

12.5mM  $(\text{NH}_4)_2\text{succinate}$ 、10mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer pH5.5、2 mM  $\text{MgSO}_4$ 、1mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1mM  $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ 、50 $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ 、12  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、0.2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MnO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% MES、0.5% Sucrose。均勻混合後以 KOH 或 HCl 調整 pH 值為 6.5 或 5.5，再經孔徑為 0.22 $\mu\text{m}$  的過濾膜進行無菌過濾後使用 (Huang et al., 1996)。

#### (b) 硝酸鉀培養液 (potassium nitrate solution)：

將上述培養液的銨鹽改為  $\text{KNO}_3$ ，最後將 pH 值調整至 5.5，其餘項目不變 (Huang et al., 1996)。

### (2) 植物種植方法：

#### (a) 種子消毒：

將適量的野生型、*cipk8-1* 突變株、*chl1-5* 突變株種子放入 2 mL 之離心管中，加入 1 mL 70%酒精放於震盪器中混勻 2 分鐘。取出酒精後加入 1 mL 消毒液 (20%漂白水以及 0.5% SDS 混合溶液)，在震盪器中均勻混合 15 分鐘。最後在無菌操作台內用 1mL 之無菌水清洗六次以去除消毒液，而後放入 4°C 三天，使種子發芽同步化。

#### (b) 植物生長環境：

將 Magenta GA-7 box(Sigma)和塑膠網，高溫高壓滅菌後放入 65°C 烘箱中烘乾。在無菌操作台中，加 57mL 的 pH6.5、12.5 mM 銨鹽培養液到 Magenta box 中，將消毒過的種子約 30 至 40 顆分別點於塑膠網上，之後於全日照生長室的迴旋震盪培養器上，生長八天。



## F. 硝酸鹽誘導 (nitrate induction)

植物生長第八天傍晚將盒中溶液以 50mL 的 pH5.5、12.5 mM 銨鹽培養液置換，12 至 16 小時後再以相同 50mL 的 pH5.5、12.5 mM 銨鹽培養液置換，進行實驗前處理 3 小時。而後以高濃度 25mM 或低濃度 200 $\mu$ M 的 50mL 的 pH5.5 硝酸鉀培養液進行硝酸鹽誘導。在指示時間點以鑷子夾取根部樣本，快速將水分吸乾後，包於錫箔紙中放入液態氮凍結，若樣本為萃取膜蛋白之用，則須立即以萃取液萃取。若是 RNA 之萃取，可置於-80°C 中保存。

## G. 基因表現分析

### (1) RNA 之萃取：

將研鉢高溫滅菌後，倒入液態氮，將樣本冷凍研磨成粉末狀，加入 1mL Trizol (Invitrogen) 快速研磨使之混合均勻，將混合液移至 1.5mL 離心管中，室溫作用五分鐘，再加入 200 $\mu$ M chloroform 搖勻，室溫兩分鐘後，以 4°C、14000rpm 離心 15 分鐘，取 1mL 上清液至於新的 1.5mL 離心管，加入等量 isopropanol 混合均勻置於-80°C 中 16 小時。隔天以 4°C、14000rpm 離心 15 分鐘後，將上清液倒乾，以 70%和 100%的酒精清洗沉澱物，室溫下待乾。以 DEPC-H<sub>2</sub>O 回溶沉澱物，取 1 $\mu$ L 的溶液稀釋 400 倍後，用分光光度計偵測 OD260 / OD280 / OD230 / OD320，以計算 RNA 的濃度與純度。RNA 樣本可置於-80°C 中保存。

### (2) 反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, 簡稱 RT-PCR)：

取 2 $\mu$ g 的 RNA 樣本加入(1 $\mu$ g)10 $\mu$ M oligo dT，置於 70°C 五分鐘，再加入 1 $\mu$ L ImpromII reverse transcriptase (Promega)，2 $\mu$ L 5x reaction buffer，4 $\mu$ L dNTP (2.5mM each)，4.8 $\mu$ L 25mM MgCl<sub>2</sub>，0.25 $\mu$ L RNase inhibitor，25°C 五分鐘，42°C 七十分鐘，70°C 十五分鐘完成反轉錄作用，cDNA 樣本保存於-20°C。

(3) 即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction, 簡稱 Q-PCR):

將完成反轉錄的 cDNA 樣本稀釋十倍後, 以 5 $\mu$ L cDNA 樣本, 2x LightCycler 480 SYBR green I Master mix, 2 $\mu$ M primer, 全數混合均勻, 利用 LightCycler 480 (Roche) 進行聚合酶連鎖反應。

#### H. 阿拉伯芥 CHL1 蛋白 Threonine101 磷酸化程度分析

(1) 植物膜蛋白 (plasmamembrane fraction) 之萃取:

將研鉢高溫滅菌後, 倒入液態氮, 立刻將剛收取下的植物根部樣本研磨成粉末狀, 加入 2mL 膜蛋白萃取液 (15mM Tris-HCl pH7.8, 250mM sucrose, 1mM EDTA, 2mM DTT, 1mM PMSF, 0.6% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 1X proteinase inhibitor cocktail (Sigma)) 快速研磨混合, 置於 2mL 離心管中以 4 $^{\circ}$ C、10000g 離心 15 分鐘, 取 1.5mL 上清液至於新的 1.5mL 超高速離心管以 4 $^{\circ}$ C、100000g 超高速離心一個鐘頭, 去除大部分上清液後, 置於 -20 $^{\circ}$ C 中保存。(Liu et al., 2003)

(2) 蛋白質樣本濃度定量:

將上述離心產物上清液去除乾淨, 以 30 $\mu$ L 4%SDS 回溶沉澱物, 利用 Bicinchoninic acid (BCA<sup>TM</sup>) protein assay kit (Thermo) 測濃度。將 BSA 配置成 0, 1, 2, 4mg/mL 的標準液, 標準液以及蛋白質樣本分別加入 200 $\mu$ L 的反應溶液, 在 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘後, 以分光光度計測定波長 570 的吸光值, 用內插法和標準曲線對應得到樣本濃度, 進行西方點墨法以測定蛋白質含量。測定 CHL1 含量時, 以 15 $\mu$ g 蛋白質樣本進行電泳; 測定 CHL1-P 含量時, 則以 35 $\mu$ g 蛋白質樣本進行電泳。

## I. 引子列表：

### 質體構築

T7 : 5'-AATACGACTCACTATAG-3'

SP6 : 5'-TTTAGGTGACACTATAG-3'

NLP7-5'-F : 5'-AAGCTTATGTGCGAGCCCGATGATAATT-3'

NLP7-RWP-R : 5'-GGATCCTCACATGGAAGTCAGGTCGAGGCCT-3'

NLP7-RWP-F : 5'-AAGCTTATGGAATTCTCGCGGCTTGATCACG-3'

NLP7-3'-R : 5'-GGATCCTCACAATTCTCCAGTGCTCTCG-3'

### 即時定量聚合酶連鎖反應 (Q-PCR)

UBQ10-F : 5' - CTTCGTCAAGACTTTGACCG - 3'

UBQ10-R : 5' - CTTCTTAAGCATAACAGAGACGAG - 3'

CHL1-F : 5' - ACGACATTATCAGTCGC - 3'

CHL1-R : 5' - CTGTCCTGTGTAGATTAACG - 3'

NRT2.1-F : 5' - AACAAGGGCTAACGTGGATG - 3'

NRT2.1-R : 5' - CTGCTTCTCCTGCTCATTCC - 3'

### *cipk8-1* 突變株中 *CIPK8* 表現量測定

CIPK8-F : 5' - TCGTGGATCGTAGCACA - 3'

CIPK8-R : 5' - TATTCTTCTGCGTCTCCTGC - 3'

## 第三章

### 結果

#### CIPK8 和 CHL1 之間的交互關係

根據本實驗室先前的微陣列分析試驗 (microarray analysis)，在對植物處理硝酸鹽時，發現在 *chl1-5* 突變株中 CIPK8 的表現量低於野生型植株；而 *chl1-5* 突變株是一 CHL1 基因缺失的突變株 (deletion mutant)，顯示 CIPK8 參與在由 CHL1 主導的硝酸鹽訊息傳遞路徑中。為了釐清 CIPK8 是否如同 CIPK23 一般，藉由磷酸化來調控 CHL1，且找出其作用機制。之前實驗室何承訓學長利用酵母菌雙雜合實驗探討 CIPK8 和 CHL1 的相互關係，結果顯示 full length CHL1 無法和 full length CIPK8 結合，但可以和 CIPK8 kinase domain 相互結合 (附圖三)。因此有一種可能性是，full length CIPK8 要跟 full length CHL1 進行結合，可能需要 CBL 蛋白幫助 CIPK8 改變其構型。在阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)，目前已發現十個 CBL 蛋白，其中 CIPK8 已知和 CBL1 以及 CBL9 都能相互結合 (kolukisaoblu et al., 2004)。

為了找出能幫助 full length CHL1 和 full length CIPK8 結合的蛋白質為何，在此就利用酵母菌三雜合實驗進行測試，若第三個蛋白質能使 CHL1 和 CIPK8 相互結合，便會驅動酵母菌中的下游報導基因  $\beta$ -galactosidase 表現，將培養基上的 X-gal 轉化利用，使菌落呈現藍色；若沒有產生結合，則菌落為白色。結果顯示 CBL1 和 CBL9 都無法成功幫助 full length CHL1 和 full length CIPK8 相互結合 (圖一)。於是便擴大範圍，測試除了 CBLs 之外可能的蛋白：(1) CIPK23 (CBL-interacting protein kinase 23)，(2) 和 CHL1 有交互作用的去磷酸酶—ANI (protein phosphatase

2C family), (3) 已知參與在 primary nitrate response 中的轉錄因子—NLP7 (nodule inception-like protein 7) 中的兩段片段：NLP7 5'-RWP domain 以及 NLP7 RWP domain-3'。由 X-gal 呈色實驗顯示，以上測試的蛋白也都無法幫助 full length CHL1 和 full length CIPK8 相互結合 (圖一)。雖然尚未找到幫助 full length CHL1 和 full length CIPK8 結合蛋白質，但在本研究中將繼續利用其他策略，從別的方向來分析 CIPK8 在硝酸鹽訊息傳導中的角色為何。

### CIPK8 對於 CHL1 硝酸鹽轉運能力的調控

目前研究已知 CHL1 為一雙親和性的硝酸鹽轉運蛋白，藉由 CIPK23 的磷酸化 Threonine101 與否，使 CHL1 能在高及低親和性作轉換，並讓 CHL1 在高低硝酸鹽濃度下皆具有吸收活性 (Ho et al., 2009)。為了探討 CIPK8 是否也會藉由磷酸化來對 CHL1 的轉運能力產生影響，在本研究中，利用非洲爪蟾卵細胞做為膜蛋白的表現系統，進行硝酸鹽吸收活性試驗。非洲爪蟾卵因為取得方便、數量多，且為真核生物系統，能提供研究者做膜蛋白質功能上或結構上的分析，是除了大腸桿菌和酵母菌之外常用的膜蛋白質表現工具。

單獨將 *CHL1* cRNA、或搭配 *CIPK8* cRNA、*CIPK8 T161D* cRNA、*CBL9* cRNA 以顯微注射的方式打入爪蟾卵細胞內，使其表現蛋白質，並培養在含有不同濃度的硝酸鹽溶液中。其硝酸鹽以同位素  $^{15}\text{N}$  做標定，分析爪蟾卵內  $^{15}\text{N}$  的含量便可得知蛙卵內硝酸鹽的含量。比較注射不同組合 cRNA 的爪蟾卵在相同時間下所吸收的硝酸鹽含量，從平均值 (n=8) 可看出同時表現 CIPK8 和 CHL1 的爪蟾卵，在低濃度 (200 $\mu\text{M}$ ) 的硝酸鹽環境下，硝酸鹽含量比單獨表現 CHL1 蛋白的爪蟾卵低了 13%，而 CIPK8 和 CBL9 同時表現時會使此下降更為劇烈，達到 30% (圖二 A.)。但在高濃度 (10mM) 硝酸鹽處理下，CIPK8 卻不會對 CHL1 的轉運能力有影響 (圖

二 B.)。推論造成此結果的原因有兩種：一是在低濃度硝酸鹽環境下，CIPK8 會降低 CHL1 蛋白在爪蟾卵中的表現量，造成進入爪蟾卵中的硝酸鹽減少；另一是 CIPK8 會對 CHL1 進行蛋白質修飾 (modification)，而改變或降低 CHL1 轉運硝酸鹽的能力。為了驗證此二種推論，在此利用西方墨點法 (western blot) 偵測單一顆非洲爪蟾卵內的 CHL1 蛋白質表現量 (圖四 A.)。由實驗結果發現，除了某幾顆爪蟾卵可能因為已死亡或是其他因素，導致無法正確表現蛋白質，使偵測到的訊號強度只等同於打 DEPC-H<sub>2</sub>O 的爪蟾卵 (背景值) 之外，CIPK8 並不會降低爪蟾卵內 CHL1 蛋白的表現量，顯示在低濃度硝酸鹽下 CIPK8 可能會對 CHL1 進行蛋白質上的修飾，例如磷酸化，且此磷酸化可能會降低 CHL1 高親和性轉運能力。

在共同表現 CBL9 和 CIPK8 時，CHL1 高親和性轉運能力下降的幅度比只表現 CIPK8 來的明顯，而 CBL9 本身卻不會對 CHL1 的轉運能力有任何影響 (圖二)，顯示 CBL9 有活化 CIPK8 的作用。對照酵母菌雙雜合實驗，雖然無法在酵母菌系統看到 CBL9 幫助 CHL1 和 CIPK8 的結合 (圖一)，但在爪蟾卵中，卻有明顯的幫助，推測無法在酵母菌系統中觀察 CBL9 作用的原因可能是因為兩蛋白質的結合必須要是相對穩定，且強度達到一定程度才能在酵母菌雙雜合系統中反應出來，顯示 CHL1 和 CIPK8 的結合或許需要特定條件才會發生，或是為一個快速短暫的反應。

另一組實驗中，則是企圖在爪蟾卵中表現 CIPK8 T161D 蛋白。因為根據前人研究發現，當 CIPKs 和 CBLs 結合後，不僅結構改變，CIPKs 還會對自身 kinase domain 進行磷酸化 (autophosphorylation)，而成為活化態 (Gong et al., 2002)。所以我們將 CIPK8 和其他 CIPKs 進行序列比對，得知 CIPK8 Threonine161 可能為 CIPK8 的自體磷酸化位置，於是將 Threonine161 以 Aspartate (Asp, D) 置換來模擬 CIPK8 的活化態 (active form)。硝酸鹽吸收活性實驗結果顯示，在此批爪蟾卵

中 CIPK8 T161D 會使 CHL1 高親和性的硝酸鹽轉運能力降低 12%，但是效果並沒有 CIPK8 明顯（降低 25%）（圖三 A.）；另外 CIPK8 T161D 對於 CHL1 低親和性硝酸鹽轉運能力同樣沒有影響（圖三 B.），針對爪蟾卵內 CHL1 蛋白表現量也利用西方墨點法去測定，結果顯示 CIPK8 T161D 同樣不會造成爪蟾卵內的 CHL1 蛋白表現量大幅度的改變（圖四 B.）。而對於 CIPK8 T161D 蛋白沒有增強 CIPK8 降低 CHL1 低親和性轉運的效果，可能的解釋是，在爪蟾卵系統中也同時存在其他蛋白酶，變因較多，使 CIPK8 T161D 在爪蟾卵中無法達到我們預期的效果，也有可能是 CIPK8T161D 本身就無法準確模擬 CIPK8 活化後的情況。

### 在阿拉伯芥中 CIPK8 對 nitrate response 的影響

由爪蟾卵硝酸鹽吸收試驗已知可能因為 CIPK8 對 CHL1 的磷酸化，進而降低 CHL1 的高親和性硝酸鹽轉運能力，有可能 CIPK8 對於 CHL1 的磷酸化也會同時改變下游 nitrate response 的表現量，所以我們便利用了一個 T-DNA 插入 *CIPK8* 基因的 *cipk8-1* 突變株進行 nitrate response 的分析。*CIPK8* 基因全長約 3Kb，此 T-DNA 是落在第四個 intron 上（圖五 A.），利用 RT-PCR 以及 *CIPK8* 專一性引子偵測 CIPK8 的 RNA 產物，發現 *cipk8-1* 突變株並沒有任何 RNA 的表現，顯示為一 knockout 突變株（圖五 B.）。本實驗中，野生株 (wild type) 和 *cipk8-1* 突變株在 PH6.5、12.5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Succinate 溶液中生長八天後，在第八天晚上將培養液以 PH5.5、12.5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Succinate 溶液置換，處理十六小時以及隔日清晨三小時的前處理。而後分別以高濃度（25mM KNO<sub>3</sub>，PH5.5）或低濃度（200μM KNO<sub>3</sub>，PH5.5）的硝酸鉀溶液分別進行 16 鐘頭的硝酸鹽誘導實驗（nitrate induction），另外也對植株處理 12.5mM KCl 作為硝酸鹽誘導的控制組。在 0、0.75、1.5、2、4、8、12、16 個鐘頭時收取植物根部樣本，萃取 RNA 樣本，反轉錄成後 cDNA 後進行 Q-PCR 分析基因表現量。在此利用兩個 nitrate response 中的指標基因：*CHL1* 以及 *NRT2.1* 作

為分析對象。Nitrate response 根據時間長短可分成兩個時期，一個鐘頭以內稱為 primary(short-term) response; 而後至 16 個鐘頭則為 secondary (long-term) response。在高濃度 (25mM) 硝酸鹽處理下時，可看到野生株中 *CHL1* 以及 *NRT2.1* 會快速被誘導表現，在 45 分鐘時就可達到最大值，而在 secondary response 中就一直維持著基礎的低表現量；*cipk8-1* 突變株中，*CHL1* 以及 *NRT2.1* 同樣會被誘導表現，但程度只剩七成，而 secondary (long-term) response，在 *cipk8-1* 突變株中的表現情形與野生株一致 (圖六)。以低濃度 (200 $\mu$ M) 硝酸鹽處理時，primary nitrate response 中基因表現量都只有高濃度硝酸鹽下的一半，而後會大幅度上升直至 16 個鐘頭，野生株和 *cipk8-1* 突變株的在任何時間點皆沒有差異 (圖七)。以上結果顯示，CIPK8 主要參與在高濃度硝酸鹽下的 primary nitrate response 中。

#### 在阿拉伯芥中 CIPK8 對於 CHL1T101 磷酸化狀態的影響

以上實驗結果顯示了在非洲爪蟾卵系統中 CIPK8 會使 CHL1 傾向低親和性的轉運蛋白，而在之前的研究顯示 CHL1T101 的磷酸化與否會決定 CHL1 對硝酸鹽的親和性，所以我們想了解若是 CIPK8 對 CHL1 的磷酸化是否也會改變 CHL1 T101 的磷酸化程度。我們利用一個辨認 CHL1T101 磷酸化與否的專一性抗體 (CHL1 T101-P) 直接分析 *cipk8-1* 突變株中 CHL1 T101 的磷酸化狀態。在本實驗中，同樣將野生株 (wild type) 和 *cipk8-1* 突變株以高濃度 (25mM KNO<sub>3</sub>, PH5.5) 或低濃度 (200 $\mu$ M KNO<sub>3</sub>, PH5.5) 的硝酸鉀溶液分別進行硝酸鹽誘導 (nitrate induction)。在 0、10、20、30、40、60 分鐘收取植物根部樣本，萃取膜蛋白，以 CHL1 抗體偵測 CHL1 蛋白的表現量以及 CHL1 T101-P 抗體偵測 CHL1 T101 的磷酸化情形。結果顯示植物處於高濃度硝酸鹽 (25mM) 環境下時，在 60 分鐘內 CHL1 蛋白的表現量不論在 Wild type 或是 *cipk8-1* 突變株中皆不會有變動 (圖八 A.)；而 CHL1T101 在高濃度硝酸鹽下是處於去磷酸化的狀態，所以在野生株中觀察不到



CHL1T101 的磷酸化情況，然而在 *cipk8-1* 突變株中 CHL1T101 也同樣無法被磷酸化（圖八 B.）。對植物處理低濃度（200 $\mu$ M）硝酸鹽時，同樣不會改變 CHL1 蛋白的表現量（圖九 A.），另一方面，隨著植株接觸硝酸鹽的時間增長，CHL1T101 會很快地被磷酸化，在 20 分鐘時就達到高峰；但在 *cipk8-1* 突變株中觀察不到這樣的磷酸化現象（圖九 B.），顯示當植物失去 CIPK8 的功能時，CIPK23 就無法對 CHL1T101 進行磷酸化。綜合以上，可推論相對於 CIPK23，CIPK8 對 CHL1 的磷酸化應為優先；而且此磷酸化對於 CHL1 T101 的磷酸化是必要的。

### CIPK8 在 CHL1 上的可能結合位置

*cipk8-1* 突變株中，CHL1 T101 在低硝酸鹽濃度下無法被 CIPK23 磷酸化；顯示在低硝酸鹽濃度下，植物需要 CIPK8 才能使 CHL1T101 被磷酸化。另外在硝酸鹽誘導基因表現的實驗中，高硝酸鹽濃度下 *cipk8-1* 突變株中基因表現量不如野生株，表示在高濃度硝酸鹽環境下，植物也需要 CIPK8 的作用才能使植物有一個高的基因表現量。綜合以上實驗結果顯示，不論在高或低硝酸鹽濃度下 CIPK8 對於 CHL1 都有不同的調控能力。這結果說明 CIPK8 對於 CHL1 的調控機制並不如原先預期的單純，在不同濃度時 CIPK8 的磷酸化對 CHL1 似乎有著不同的影響，我們推測 CIPK8 在 CHL1 上的磷酸化位置可能不只一個。我們已知 CHL1 是以 c-terminal 區域和 CIPK8 進行結合，若能縮小範圍找到 CIPK8 在 CHL1 上的結合位置，便可預測 CIPK8 對 CHL1 進行磷酸化的胺基酸為何，就可對此胺基酸進行分析。

在此利用酵母菌雙雜合實驗，測試 CIPK8 kinase domain 對於 CHL1 各個區域（附圖四）的結合能力。將不同區域片段的 CHL1 和 CIPK8 kinase domain 共同轉殖進入酵母菌株，由 X-gal 呈色實驗及  $\beta$ -galactosidase 的活性定量結果可看出 CHL1

TM7-TM12 (transmembrane domain 7 to transmembrane domain 12) 和 CIPK8 kinase domain 有很強的結合能力，而 CHL1 TM1-TM6 和 CIPK8 kinase domain 的組合， $\beta$ -galactosidase 活性定量強度只等同於 NubG (negative control)，表示兩者毫無結合能力 (圖十 A.)。再次驗證了相對於 N-terminal，CHL1 的 C-terminal 部分才是和 CIPK8 kinase domain 真正發生交互作用的地方。

接著為了詳細分析 CIPK8 kinase domain 在 CHL1 C-terminal 部分的結合位置，我們將 CHL1 蛋白從尾端逐漸切除，發現並不會影響 CHL1 和 CIPK8 kinase domain 的結合能力，直到 CHL1 結構只剩下 TM1-TM 8 時，和 CIPK8 kinase domain 的結合強度才有顯著下降；另外，也將 CHL1 蛋白從前端逐漸切除，比較 TM7-TM12 / TM9-TM12 / TM11-TM12 這三個片段和 CIPK8 kinase domain 的結合強度，從 X-gal 呈色上觀察不到明顯差異；但是  $\beta$ -galactosidase 活性定量上則可看出雖然 TM9-TM12 / TM11-TM12 和 CIPK8 kinase domain 的結合強度比起 TM7-TM12 稍弱一些，但仍和 full length CHL1 有相似的結合強度 (圖十 B.)。

綜合上述結果，推論 CIPK8 kinase domain 和 CHL1 結合的位置可能有兩處：  
一、由於 CHL1TM1-TM11 / CHL1TM1-TM10 / CHL1TM1-TM9 以及 full length CHL1 四者和 CIPK8 kinase domain 結合強度相近，而 CHL1TM1-TM8 和 CIPK8 kinase domain 結合強度卻明顯比 CHL1TM1-TM9 弱。根據 CHL1 結構示意圖可知，在 TM8 和 TM9 之間有一個位於細胞質中的小 loop，實驗中觀察到 CHL1TM1-TM8 和 CIPK8 kinase domain 結合強度下降，可能就是因為缺少這個 loop 所致，所以推論 CHL1 TM8 和 TM9 之間的 loop 為 CIPK8 kinase domain 可能結合位置之一。

二、CHL1 TM11-TM12 和 CIPK8 kinase domain 很明顯地有結合的能力，顯示在 CHL1 C-terminal end 可能擁有另一個 CIPK8 kinase domain 的結合位。而 CHL1

的結構上在 TM12 後方有一段落在細胞質中的 C-terminal end，此處可能就是 CIPK8 kinase domain 在 CHL1 上的第二處結合位。以上實驗結果顯示，CHL1 的確存在著一個以上的 CIPK8 結合位，而下一步便可針對這兩處的結合位上的氨基酸進行分析，釐清是否皆具有可被 CIPK8 磷酸化的胺基酸。

另外 CHL1 在 TM6 和 TM7 之間有一個位於細胞質內，長 102 個胺基酸的 central loop，由於此 loop 佔整個 CHL1 蛋白結構比例頗重，猜測這個 loop 是不是也會對 CHL1 和 CIPK8 kinase domain 的結合造成影響，於是利用了一個只剷除 central loop 的 CHL1 蛋白 (CHL1 dloop)，和 CIPK8 kinase domain 進行結合試驗。結果顯示失去了 loop 的 CHL1 和 CIPK8 kinase domain 的結合能力反而增強許多 (圖十)，意味此 loop 也可能干擾 CHL1 和 CIPK8 kinase domain 的結合。



## 第四章

### 討論

#### CIPK8 和 CHL1 的交互關係

本研究中，最先企圖釐清的就是 CHL1 和 CIPK8 的交互關係。由於 full length CHL1 和 full length CIPK8 並不能結合（附圖二）。於是利用酵母菌三雜合試驗來測試可能幫助兩蛋白結合的蛋白為何。結果發現 CBL1、CBL9、ANI、CIPK23、NLP7(5'-RWPdomain)、NLP7(RWPdomain-3')皆沒有幫助的效果（圖一）。不過在爪蟾卵細胞吸收活性實驗中，CBL9 又可幫助 CIPK8 對於 CHL1 的調控能力，顯示 CIPK8 有可能是靠著 CBL9 來活化的，只是在酵母菌系統中因為結合強度不足或是需要特定的結合條件，才無法呈現。

另外利用 CIPK8 kinase domain 和不同 CHL1 片段進行結合能力測試時，意外發現 CHL1 的 central loop 會對 CHL1 和 CIPK8 kinase domain 有干擾作用（圖十）。根據實驗室何承訓學長先前實驗，central loop 同樣也會干擾 CHL1 和 CIPK23 的結合。CIPK8 是和 CHL1 的 C 端結合，CIPK23 則是和 CHL1 的 N 端結合，CHL1 的 central loop 能同時干擾 CIPK8 和 C 端的結合以及 CIPK23 和 N 端的結合，可見 central loop 可能可以左右擺動，對於 CHL1 本身也有著一定的調控能力。何承訓學長也發現 ANI 會結合在此 central loop 之上，而且 ANI 可能藉由調控 central loop 的方位而增加 CIPK23 與 full length CHL1 的結合。而在我的實驗中發現 ANI 無法增強 CIPK8 和 full length CHL1 的結合能力，可見 CIPK8 的調控機制不同於 CIPK23，而 CHL1、CIPK8、CIPK23 以及 ANI 四者之間是如何相互運作，也是我們下一步渴望回答的問題。

## CIPK8 的作用機制假說

本研究中，我們期望釐清 CIPK8 在硝酸鹽訊息傳導中的機制，並且想了解 CIPK8 是否會和其他蛋白共同影響了 CHL1 的轉運能力或是硝酸鹽的訊息傳導。之前實驗室的研究指出低硝酸鹽的情況下 CIPK23 會磷酸化 T101，於是首先利用 CHL1 T101-P 的抗體來確認 *cipk8-1* 突變株內 CHL1 T101 的磷酸化狀態，發現不論在高或低的硝酸鹽濃度下 CHL1T101 都無法被磷酸化(圖八 / 圖九)，顯示在低硝酸鹽濃度下，CIPK23 仍需要在 CIPK8 的作用下才可對 CHL1T101 磷酸化。因此我們推論，在 CHL1C-terminal 區域可能有一個 CIPK8 的磷酸化位置，且此磷酸化位置會在低硝酸鹽濃度下先被 CIPK8 磷酸化，而後才促使 CIPK23 對 CHL1T101 進行磷酸化。當兩處皆被磷酸化時，CHL1 便轉為高親和性的硝酸鹽轉運蛋白，並使下游的 primary nitrate response 為低表現量。

根據上述的推論，CIPK8 可能參與在 high affinity 的 primary nitrate response 中，然而在硝酸鹽誘導基因表現的分析中，發現 *cipk8-1* 突變株中 nitrate response 只在 low affinity 的 short-term phase 比野生株的表現量低，其餘皆無差異，顯示 CIPK8 參與在 low affinity 的 primary nitrate response 中(圖六 / 圖七)(附圖五)。這樣的實驗結果讓我們推論 CHL1 可能還擁有另外一個 CIPK8 的磷酸化位置，且此位置可能只會在高濃度硝酸鹽環境下被 CIPK8 磷酸化。如此一來，我們推測 CHL1 是否存在著兩個 CIPK8 的磷酸化位置，兩個位置的磷酸化是由不同的反應所驅動，且對 CHL1 擁有不同的調控。由酵母菌雙雜合的實驗顯示 CHL1 的 C-terminal end 和第八、第九穿膜區域間的 loop 都是 CIPK8 的可能結合區域(圖十)。於是我們便推測相對於 T101 為 CIPK23 的磷酸化位，CIPK8 在 CHL1 C-terminal 可能擁有兩個磷酸化位，這兩個磷酸化位置對 CHL1 可能擁有各自的調控效果。

綜合以上，我們提出一個 CIPK8 可能的作用機制（圖十一）：CIPK8 在 CHL1 C-terminal 區域擁有兩個磷酸化位（簡稱為 P1 / P2）。而 CHL1 的 N-和 C-terminal 區域可能是利用 CIPK8 以及 CIPK23 分開進行磷酸化修飾，而兩區域對 CHL1 的轉運能力和硝酸鹽感知能力都有各自的調控能力。在外界環境沒有硝酸鹽時，P1 / P2 皆為去磷酸化態，一旦植物接觸到硝酸鹽，CIPK8 就會將 P1 磷酸化，此一磷酸化對於 CHL1T101 磷酸化扮演促進角色，是 CIPK23 能磷酸化 CHL1T101 的先決條件。在低硝酸鹽濃度下，CIPK8 將 P1 磷酸化之後，CIPK23 隨之將 T101 磷酸化，此時 CHL1 便是一高親和性的硝酸鹽轉運蛋白，且使下游 primary nitrate response 為低表現量。不同於 P1，P2 的磷酸化是反應硝酸鹽濃度的高低，當植物處於高硝酸鹽濃度下時 CIPK8 才會對 P2 進行磷酸化，使 CHL1 便轉為低親和性的硝酸鹽轉運蛋白，primary nitrate response 的表現量也會隨之提高。

我們無法確定的是，P2 磷酸化使 CHL1 轉為低親和性轉運蛋白是否與 CHL1T101 的磷酸化有關連。我們實驗室之前的證據顯示：T101 的磷酸化與否是決定 CHL1 在高低親和性之間轉換的重要決定因素。所以，有可能 P2 的磷酸化會促使 CHL1T101 去磷酸化，或是抑制 CHL1T101 的磷酸化而使 CHL1 轉為低親和性轉運蛋白。這可以解釋，高硝酸鹽濃度下野生株內 CHL1T101 不會被磷酸化的結果。然而也有另一種可能性是 CHL1C-或 N-兩端都有獨立控制高或低親和性轉換的能力，N 端 T101 的磷酸化會促使 CHL1 轉為高親和性轉運蛋白，而 C 端的 P2 磷酸化會促使 CHL1 轉為低親和性的轉運蛋白。

雖然在我們 P1/P2 的假說中，我們認為只有在高硝酸鹽濃度下 P2 才會被 CIPK8 磷酸化而轉為低親和性轉運蛋白；但非洲爪蟾卵硝酸鹽吸收實驗中，當同時注射 CHL1 和 CIPK8 cRNA 時，在低硝酸鹽濃度下，已觀察到高親和性的吸收能力降低。有可能是因為大量表現 CIPK8 促使 CHL1 的 P1 / P2 皆被高度磷酸化。因為 P2 已

磷酸化，這時 CHL1 便因為 P2 被磷酸化而處於低親和性狀態，所以在爪蟾卵硝酸鹽吸收實驗中，才會觀察到 CHL1 的高親和性轉運能力有降低（圖二 / 圖三）。

### T101 及 P2 磷酸化對基因表現量的影響

之前實驗室的研究顯示，T101 是決定基因表現量高或低的重要因素。在 CHL1T101A 的轉殖植株中，不論高或低硝酸鹽濃度，都會誘發高劑量的基因表現（附圖六）。相反的，CHL1T101D 的轉殖植株中，不論高或低硝酸鹽濃度，都會誘發低劑量的基因表現。然而在 *cipk8-1* 突變株中 P1 / P2 / CHL1T101 皆為去磷酸化態，如果 T101 的磷酸化是唯一決定基因表現量的因素，則 *cipk8-1* 突變株應該要有如 CHL1T101A 轉殖植株一樣的高劑量基因表現。然而我們觀察到的是，不論在高或低硝酸鹽濃度下，*cipk8-1* 突變株 primary nitrate response 表現量都不如 CHL1T101A 轉植株（附圖五和附圖六）。這顯示，誠如我們在 P1 / P2 的假說中所提出的，P2 的磷酸化也是控制基因表現的重要因素。P2 會在高濃度硝酸鹽下被 CIPK8 磷酸化，而讓下游 primary nitrate response 擁有高的表現量。因此我們推測，很有可能 CHL1 N 端 T101 的磷酸化，和 C 端 P2 的磷酸化都是調控基因表現量的重要因素，至於兩者之間的交互調控，仍有待進一步地確認。

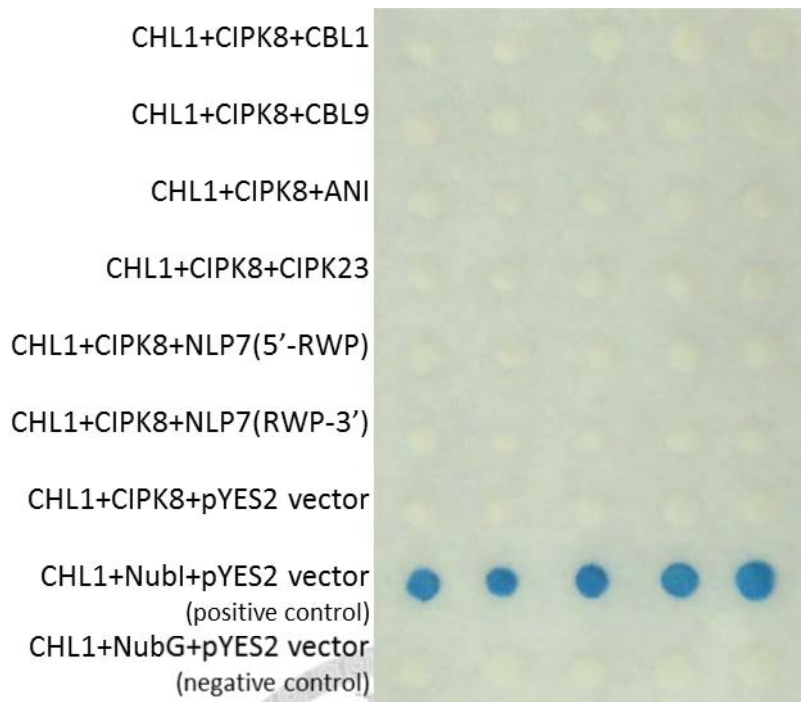
### 磷酸化對於 CHL1 結構的影響

雖然 CHL1 蛋白的結構仍未被科學家解出，但 CHL1 在原核生物中的同源蛋白（homologue）Pep<sub>so</sub> 的結構在去年已被解出。Pep<sub>so</sub> 擁有十四個穿膜的 Helix，在中央有兩個可和受質結合的 cavity，主要是負責胜肽（peptide）的吸收。在運輸受質時，Pep<sub>so</sub> 必須有結構上的改變，其便是利用 N-terminal 和 C-terminal 區域上不同的 Helix 來控制（附圖六）（Newstead et al., 2011）。該篇論文的作者推論，當接

受外界受質時，由 Helix2 和 Helix7 的拉動讓 Pep<sub>so</sub> 的 cavity 朝胞外開放，以和受質結合。而後換由 N-terminal 的 Helix4 / Helix 5 以及 C-terminal 區域的 Helix 10 / Helix 11 拉動，使 Pep<sub>so</sub> 結構改向胞內開放，釋出受質 (Newstead et al ., 2011)。此模型顯示轉運蛋白可能會由 N-terminal 和 C-terminal 構性上的改變，共同調控轉運功能。

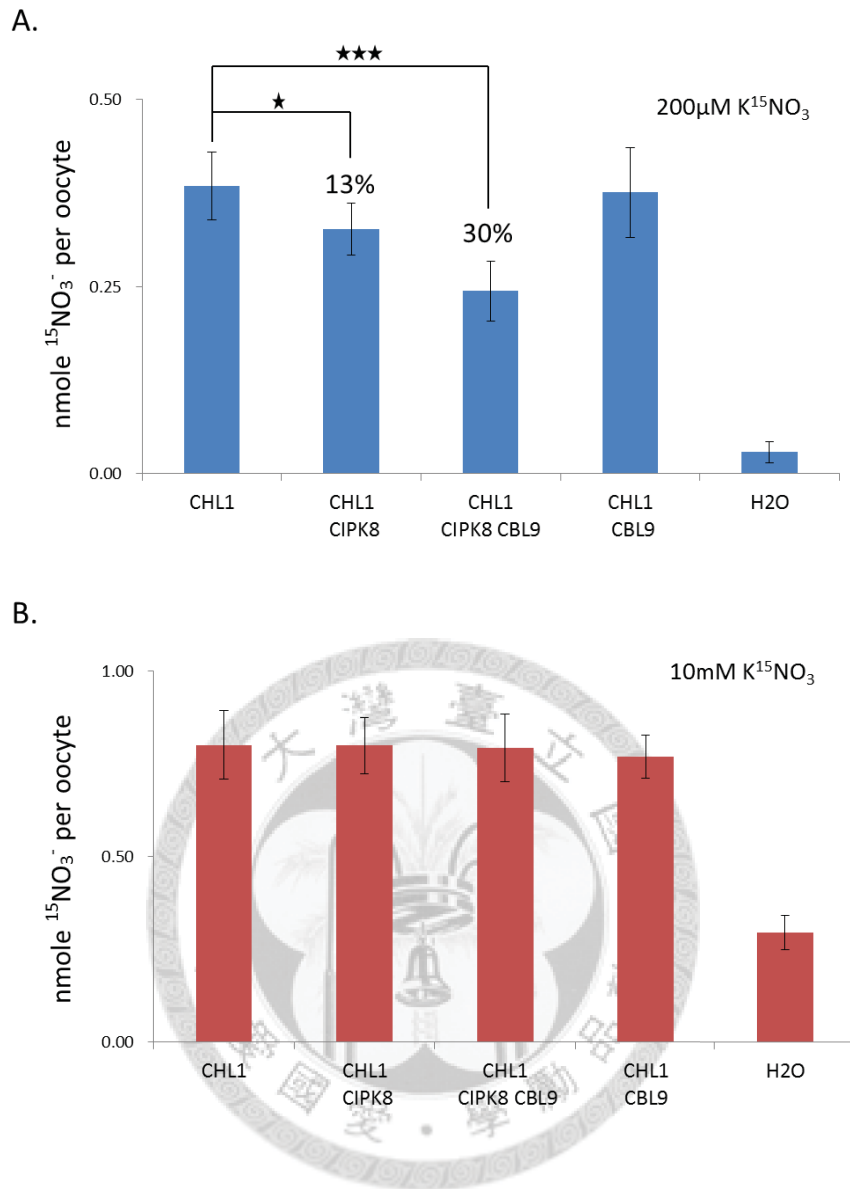
回到 CHL1 的例子，CIPK23 會對 N-terminal 的 T101 進行磷酸化，而 CIPK8 的磷酸化位置則位於 CHL1 的 C-terminal。上述的研究成果便讓我們推測，CHL1 有可能就是藉由 CIPK8 和 CIPK23 在不同濃度的硝酸鹽環境下，對自身 C-terminal 和 N-terminal 進行磷酸化，而每個位置的磷酸化與否，會造成 CHL1 結構裡的 Helix 有不同程度的拉動，如此一來，我們推論 CIPK8 和 CIPK23 會共同藉由磷酸化來影響 CHL1 N-和 C-terminal 區域結構的動態，調控 CHL1 對硝酸鹽感知能力以及轉運能力。本實驗室陳國恩學長，將 CHL1 上幾個可能為 CIPK8 磷酸化位的氨基酸突變後，利用非洲爪蟾卵吸收實驗，觀察是否改變 CHL1 的硝酸鹽轉運能力。其中將 CHL1 Y480/T481 同時突變為 CHL1 Y480A/T481A 時，發現 CHL1 只剩下高親和性的轉運能力，顯示 480 或 481 去磷酸化時會促使 CHL1 轉為高親和性的硝酸鹽轉運蛋白，雖然 CHL1 Y480 或 T481 是否真的為 CIPK8 的磷酸化位之一，仍須實驗驗證，但也給了我們一個佐證是，CHL1 的 N-或 C-terminal 區域可能都存在著調控 CHL1 的能力。





圖一· CBL1、CBL9、CIPK23、ANI、NLP7 皆無法幫助 full length CIPK8 和 full length CHL1 相互結合

以 full length CHL1 為 bait，full length CIPK8 為 prey 進行酵母菌雙雜合的試驗中，共同轉殖以 pYES2 為載體的 pYES2-CBL1、pYES2-CBL9、pYES2-CIPK23、pYES2-ANI、pYES2-NLP7(5'-RWP)、pYES2-NLP7(RWP-3')的 DNA，並利用 galactose 誘導 pYES2 上的基因表現，而後利用 X-gal 呈色試驗測定 full length CHL1 和 full length CIPK8 的結合強度。



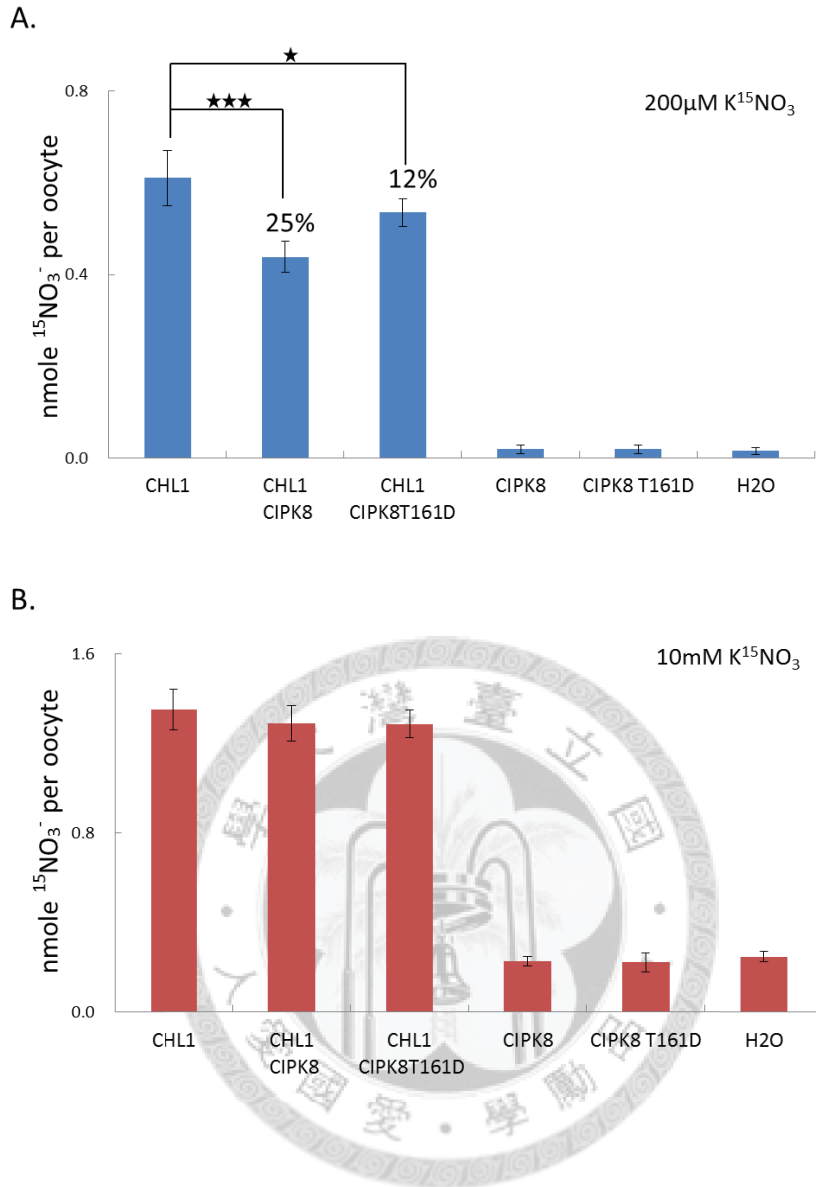
圖二· CIPK8 會降低 CHL1 的高親和性硝酸鹽轉運能力

將 CHL1 / CIPK8 / CBL9 / DEPC-H<sub>2</sub>O 顯微注射進爪蟾卵中，將帶有不同的蛋白組合的爪蟾卵培養在 200µM (圖 A.) 或 25mM (圖 B.) 的 K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> 溶液中兩個鐘頭，並分析卵內 <sup>15</sup>N 的含量。此組實驗為八顆爪蟾卵硝酸鹽含量的平均值 (n=8)。並利用 T-test 做統計分析

★★★★ P < 0.0001

★★ P < 0.001

★ P < 0.05



圖三· CIPK8 T161D 會降低 CHL1 的高親和性硝酸鹽轉運能力

將 CHL1 / CIPK8 / CIPK8 T161D / DEPC-H<sub>2</sub>O 顯微注射進爪蟾卵中，將帶有不同蛋白組合的爪蟾卵培養在 200 $\mu$ M (圖 A.) 或 25mM (圖 B.) 的 K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> 溶液中兩個鐘頭，並分析卵內 <sup>15</sup>N 的含量。此組實驗為十顆爪蟾卵硝酸鹽含量的平均值(n=10)。

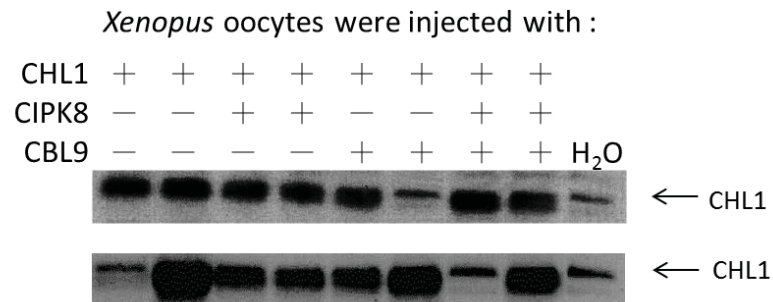
並利用 T-test 作統計分析

★★★ P < 0.0001

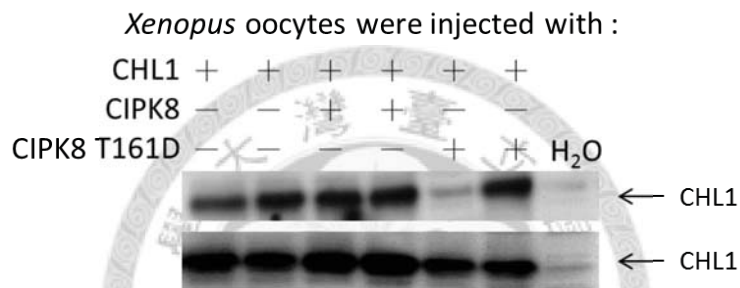
★★ P < 0.001

★ P < 0.05

A.

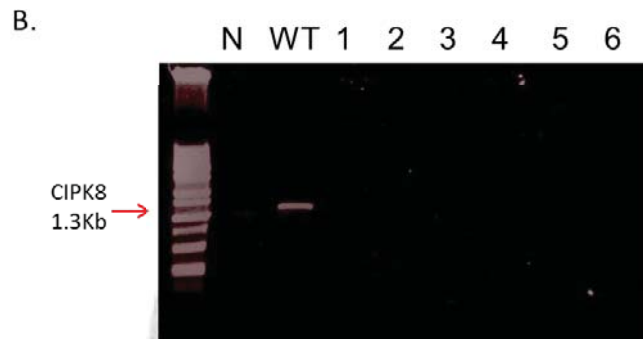
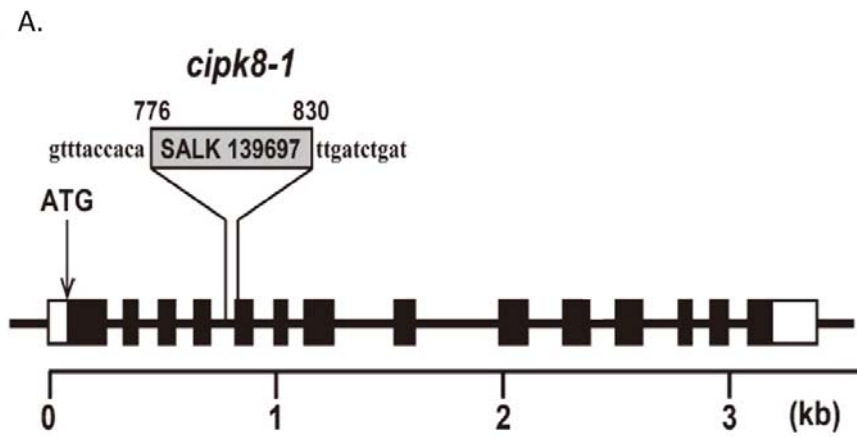


B.



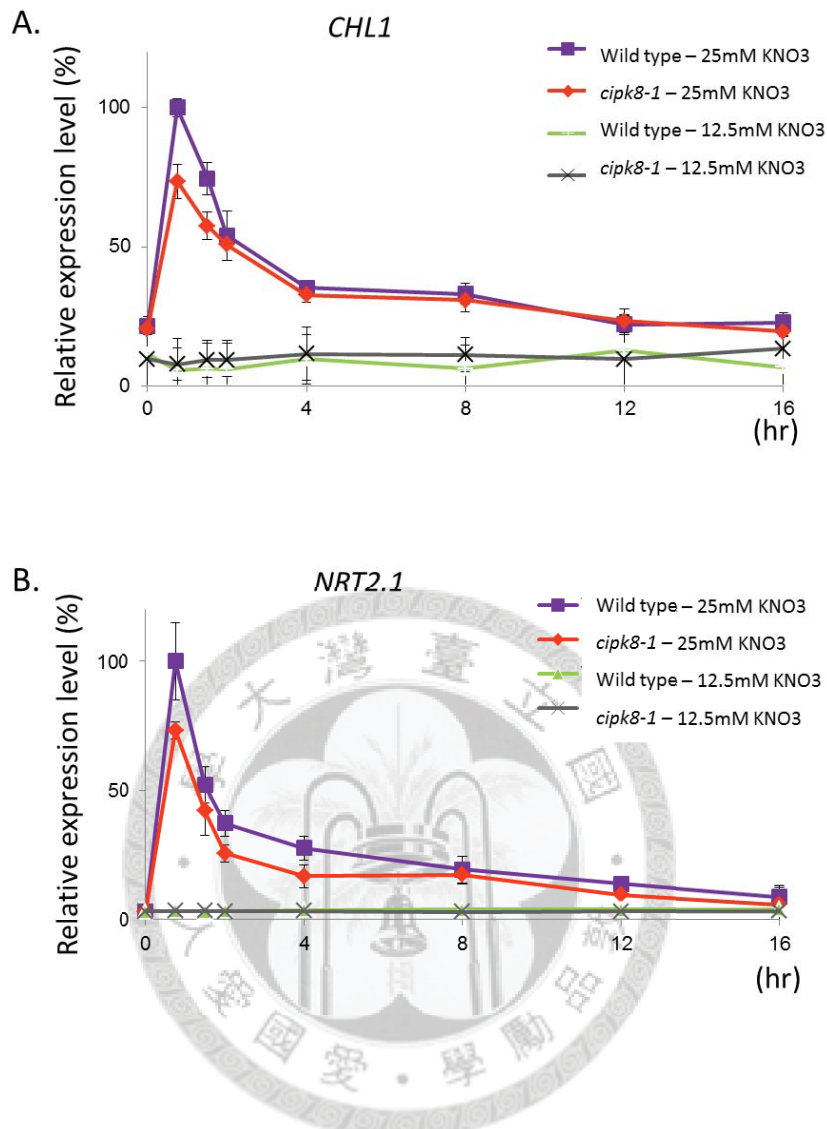
圖四· CHL1 蛋白在爪蟾卵中的表現量並不會因為和 CIPK8、CIPK8 T161D 或 CBL9 同時表現而改變

打入 cRNA 爪蟾卵在 ND96 溶液（含鈣離子）中培養兩天，待其蛋白質表現，再將爪蟾卵內的蛋白質萃取出，回溶於 35 $\mu$ L 的萃取液、15 $\mu$ L 4x dye、10 $\mu$ L 1M DTT 進行西方點墨實驗，以 CHL1 抗體偵測單一顆爪蟾卵中 CHL1 蛋白的表現情況，上下每一條 band 皆為單一顆爪蟾卵樣本，取 20 $\mu$ L（1/4 顆的蛋白量）。



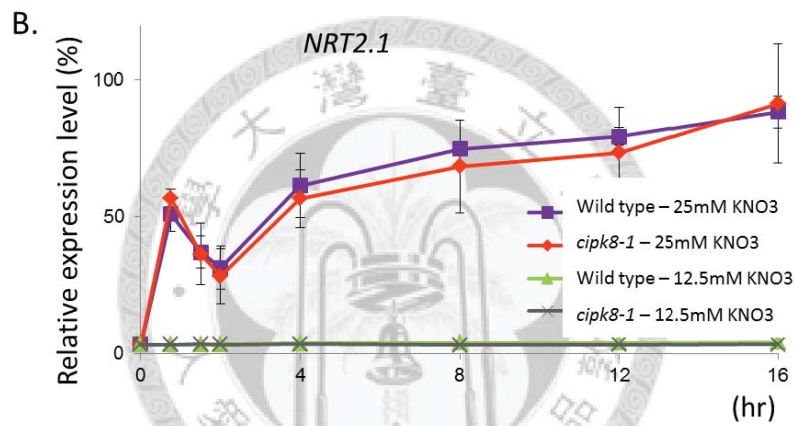
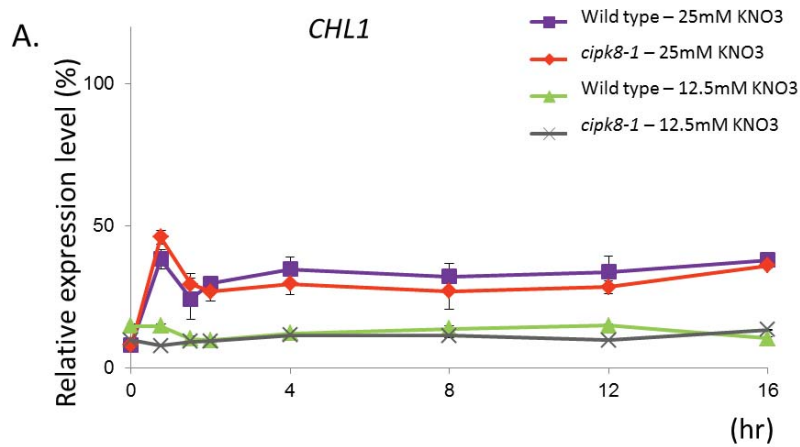
圖五· T-DNA 在 *cipk8-1* 突變株中插入的位置

T-DNA 坐落在 *CIPK8* 的第四個 Intron 上(圖 A.)，萃取 *cipk8-1* 突變株根部的 RNA 樣本，RT-PCR 後，利用 *CIPK8* 專一性引子進行 PCR，N 為無添加 cDNA 樣本做為 negative control，WT 為野生株 cDNA 樣本，1 到 6 為六群 *cipk8-1* 突變株 cDNA 樣本。



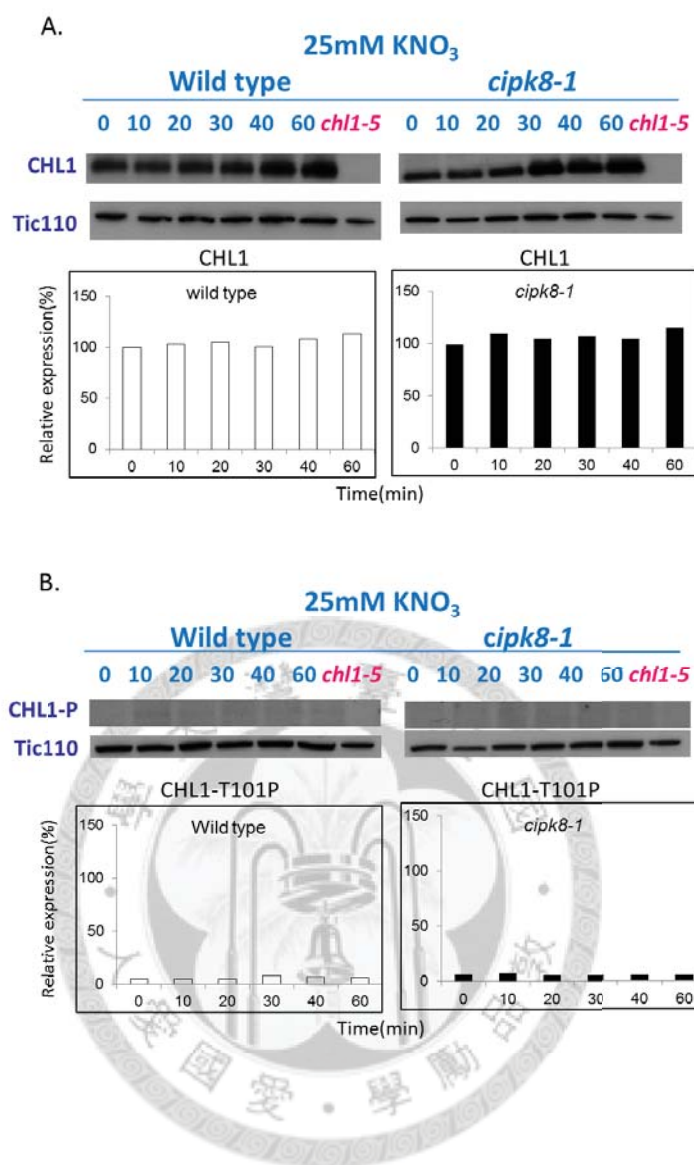
圖六· CIPK8 參與在 Low-affinity primary (short-term) nitrate response 中

萃取不同時間點之植株根部 RNA 樣本，進行 RT-PCR 後，利用 Q-PCR 分析 *CHL1* (圖 A.) *NRT2.1* (圖 B.) 的表現量，另處理 12.5mM KCl 作為硝酸鹽誘導的控制組，橫軸為和 *UBQ10* 的表現量 normalize 後之數值。單一樣本 (N) 為三株植株混合，實驗結果為三個樣本 (N=3) 之平均。



圖七· CIPK8 不影響 High-affinity nitrate response

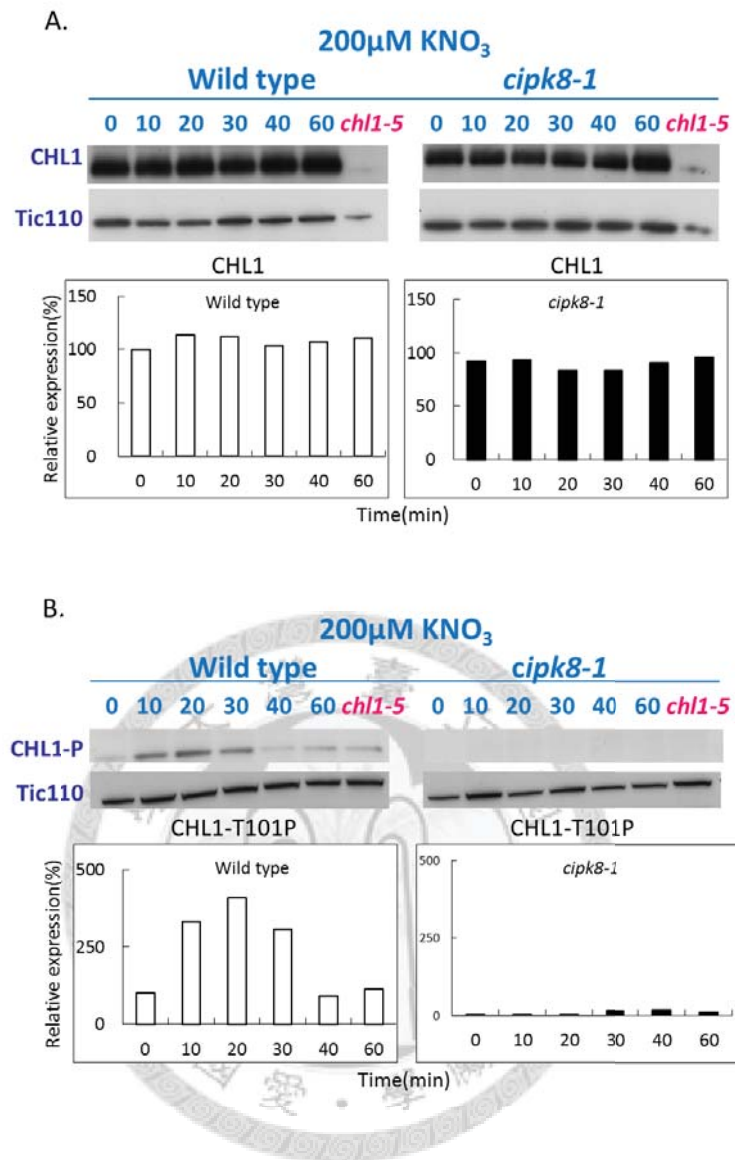
萃取不同時間點之植株根部 RNA 樣本，進行 RT-PCR 後，利用 Q-PCR 分析 *CHL1* (圖 A.) *NRT2.1* (圖 B.) 的表現量，另處理 12.5mM KCl 作為硝酸鹽誘導的控制組，橫軸為和 *UBQ10* 的表現量 normalize 後之數值。單一樣本 (N) 為三株植株混合，實驗結果為三個樣本 (N=3) 之平均。



圖八· 在高濃度硝酸鹽下 *cipk8-1* 突變株中的 CHL1 T101 仍為去磷酸化態

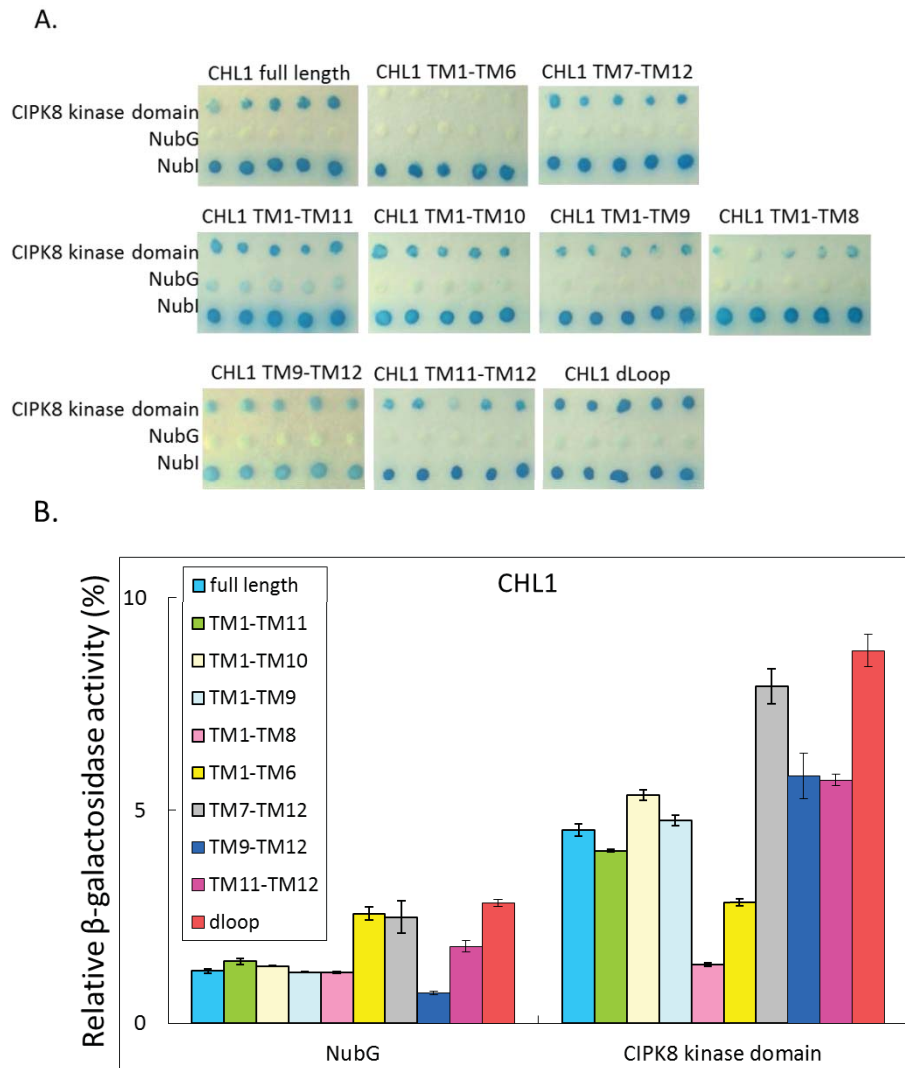
野生株和 *cipk8-1* 突變株處理 25mM 的硝酸鹽，萃取膜蛋白進行電泳後，以 CHL1 抗體以及 CHL1 T101-P 抗體偵測定量，*chl1-5* 為 CHL1 基因缺失突變株 (gene deletion mutant) 在此作為 negative control，而 Tic110 為 loading control。





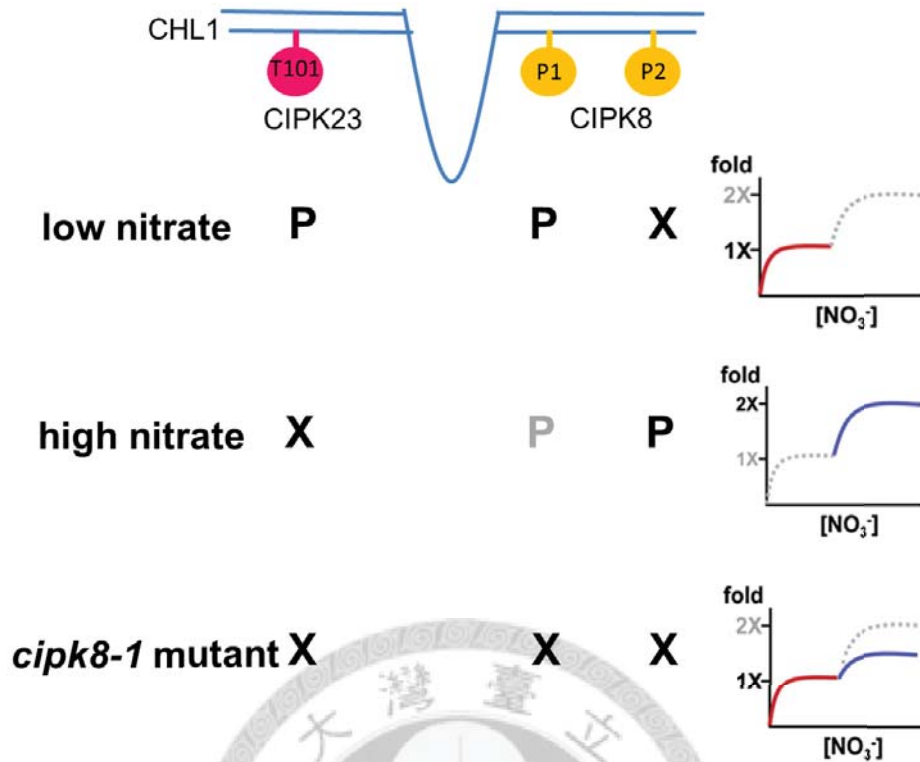
圖九· 在低濃度硝酸鹽下 *cipk8-1* 突變株中 CHL1 T101 無法被磷酸化

野生株和 *cipk8-1* 突變株處理 200 $\mu$ M 的硝酸鹽，萃取膜蛋白進行電泳後，以 CHL1 抗體以及 CHL1 T101-P 抗體偵測定量，*chl1-5* 為 CHL1 基因缺失突變株 (gene deletion mutant) 在此作為 negative control，而 Tic110 為 loading control。



圖十· CHL1 TM8 和 TM9 之間的 loop 以及 TM12 後的 C-terminal end 為 CIPK8 kinase domain 的兩處結合位

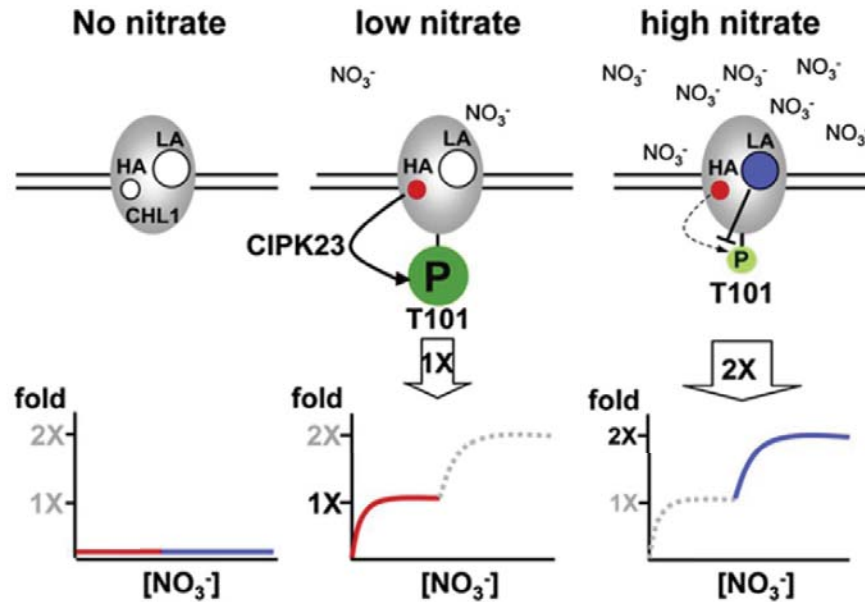
將 CIPK8 kinase domain 以及各 CHL1 片段共同轉殖進入酵母菌株，以 X-gal 呈色實驗（圖 A.）及  $\beta$ -galactosidase 的活性定量（圖 B.）試驗分析其結合強度。



圖十一· CIPK8 作用機制假說

CIPK8 在 CHL1 C-terminal 上有兩個結合位，標示為 P1、P2。下方 P 代表在低或高硝酸鹽濃度時，此位置會被磷酸化；X 則表示去磷酸化狀態。右方表示 primary nitrate response 的程度，紅線為 high-affinity phase；藍線為 low-affinity phase，而虛線則為在野生株中的表現情形。

## The CHL1-mediated Nitrate Sensing model

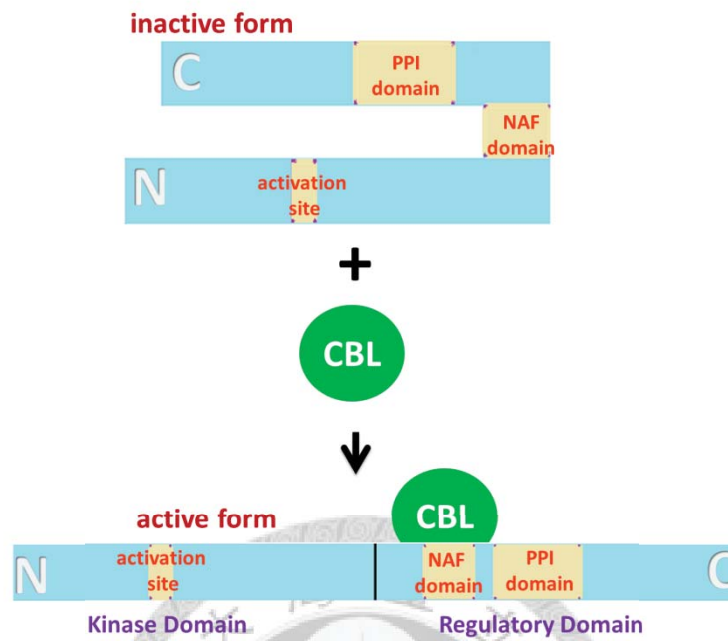


( Ho et al., 2009 )

附圖一· 由 CHL1 主導的硝酸鹽訊息傳遞模式圖

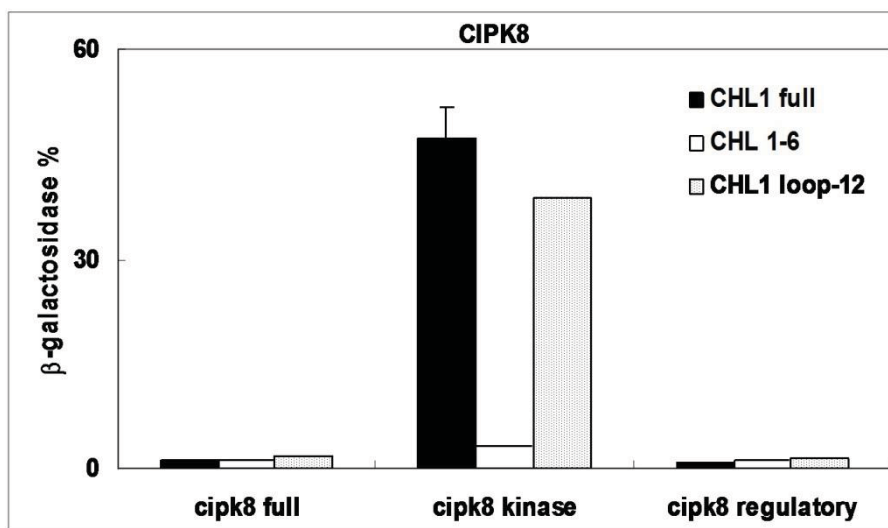
CHL1 改變自身磷酸化狀態，使 primary nitrate response 產生不同程度的反應來適應不同硝酸鹽濃度環境。當 CHL1 感知到外界環境為低濃度的硝酸鹽環境時，會透過 CIPK23 對自身 T101 的磷酸化使 CHL1 對硝酸鹽擁有高親和性，得以在低濃度下吸收硝酸鹽，也會造成下游的基因的表現量較低。若外界為高濃度硝酸鹽環境時，此時 CHL1 為去磷酸化態，會促進下游基因有較高的表現量。

## CIPKs-CBLs Interaction



附圖二· CIPKs-CBLs Interaction Model

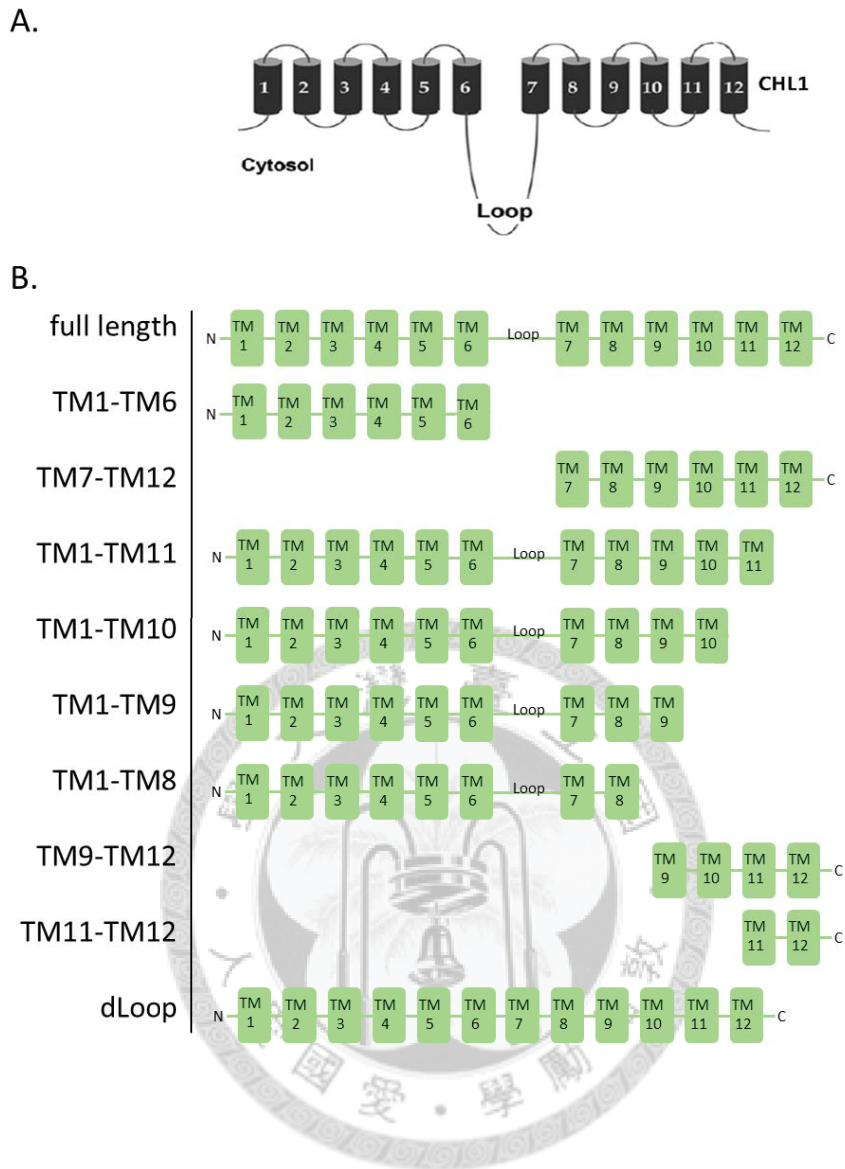
CIPKs 需要 CBLs 結合在自身的 NAF domain 後，造成結構改變，才轉為活化態具有磷酸激酶的活性。



By 何承訓學長

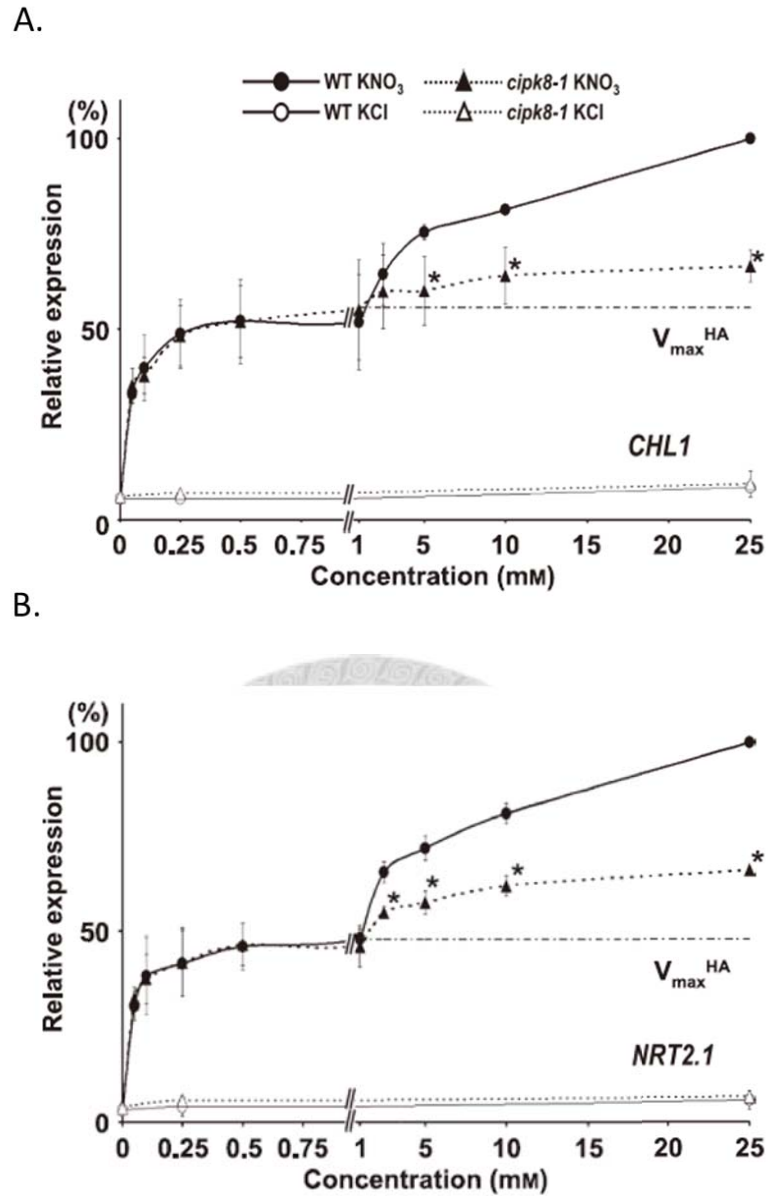
附圖三· CHL1 只能和 CIPK8 kinase domain 相互結合

以 full length CHL1、CHL1 TM1-TM6、CHL1 loop-TM12 作為 bait，而 full length CIPK8、CIPK8 kinase domain、CIPK8 regulatory domain 作為 prey。兩兩組合進行酵母菌雙雜合試驗，並測定  $\beta$ -galactosidase 酵素強度，以代表兩蛋白結合強度。



附圖四· 圖十實驗中使用的各個不同 CHL1 區域片段示意圖

圖 A 為 CHL1 結構示意圖，其擁有十二個穿膜區域（transmembrane domain），在第六、第七穿膜區域間有一個位於細胞質內的 Loop。圖 B 為在圖三實驗中所使用到的各個 CHL1 片段示意表。

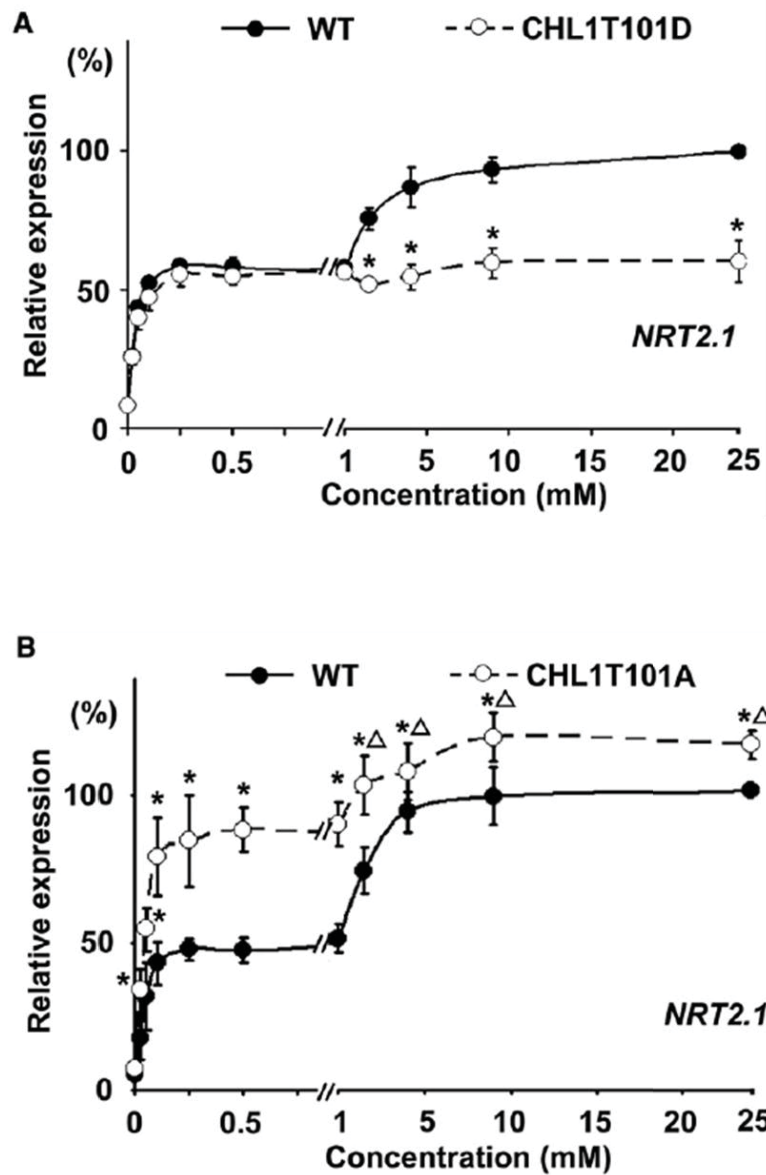


(Hu et al.,2009)

附圖五· 在 *cipk8-1* 突變株中 low affinity 的 primary nitrate response 表現量低於野生株

將野生株及 *cipk8-1* 突變株處理不同濃度的硝酸鹽溶液，進行三十分中的硝酸鹽誘導，收取根部樣本，利用 Q-PCR 分析 *CHL1* (圖 A.) *NRT2.1* (圖 B.) 的表現量。

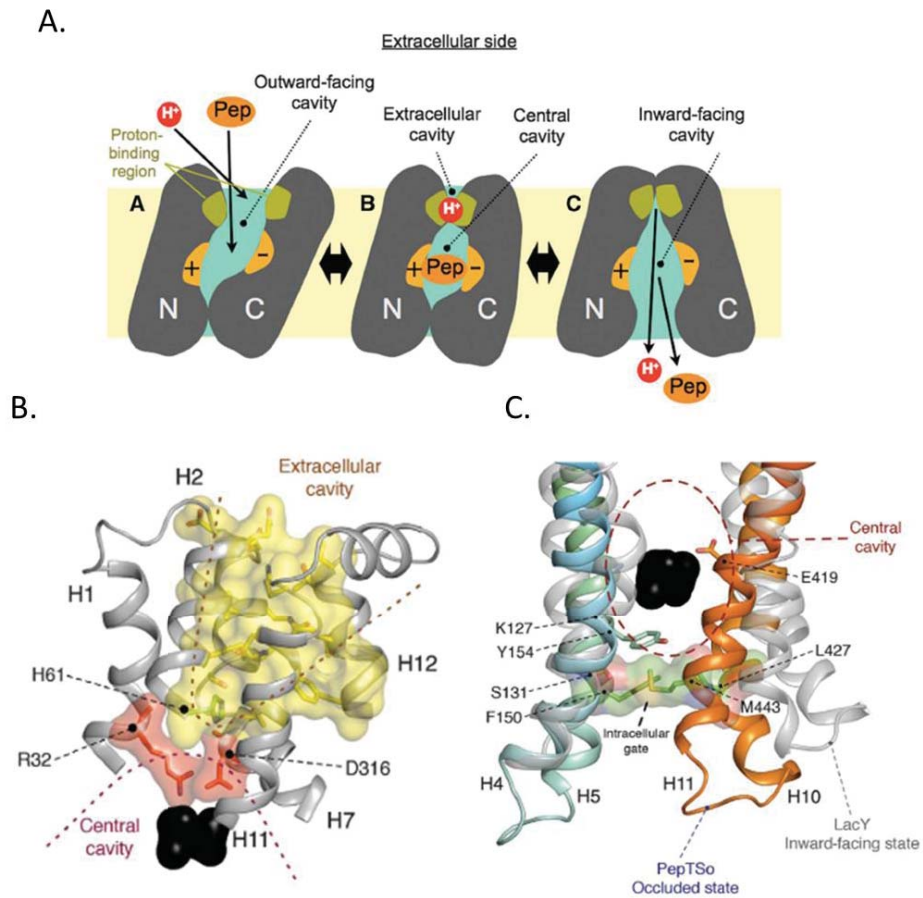




(Ho et al., 2009)

附圖六· CHL1 T101A 和 CHL1 T101D 轉殖株中的 primary nitrate response

將 CHL1 T101D (圖 A.) 和 CHL1 T101A (圖 B.) 轉殖株處理不同濃度的硝酸鹽溶液，進行三十分中的硝酸鹽誘導，收取根部樣本，利用 Q-PCR 分析 *NRT2.1* 的表現量。



(Newstead et al., 2011)

附圖七· PepTso 蛋白的作用機制與結構示意圖

圖 A.為 PepTso 蛋白的作用機制假說。當要吸收胜肽時，由 Helix2 和 Helix7 的拉動讓 Pep<sub>so</sub> 的 cavity 朝胞外開放 (圖 B.)，當 Helix4/Helix5 以及 Helix10/Helix 11 相互拉動時，Pep<sub>so</sub> 結構改向胞內開放，釋出受質 (圖 C.)。

## 參考文獻

- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., and Kudla, J.** (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca<sup>2+</sup>-regulated kinase. *EMBO J* **20**, 1051-1063.
- Batistic, O., and Kudla, J.** (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* **219**, 915–924.
- Batistic O., and Kudla, J.** (2009). Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 985-992.
- Castaings, L., Camargo, A., Pocholle, D., Gaudon, V., Texier, Y., Boutet-Mercey, S., Taconnat, L., Renou, J.P., Daniel-Vedele, F., and Fernandez, E.,** (2009). The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J.* **57**, 426–435.
- Crawford, N.M.** (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859–868.
- Gong, D.M., Gong, Z.H., Guo, X.Y., and Zhu J.K.** (2002). Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel *Arabidopsis* protein kinase. *J Biol Chem* **277**, 28340-28350.

**Hashimoto, K., Eckert, C., Anschütz, U., Scholz, M., Held, K., Waadt, R., Reyer, A., Hippler, M., Becker, D., and Kudla, J.** (2012). Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. *J Biol Chem* **287**, 7956-7968.

**Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., and Tsay, Y.F.** (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184–1194

**Huang, C., Ding, S., Zhang, H., Du, H., and An, L.** (2011). CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **181**, 57-64.

**Huang, N.C., Chiang, C.S., Crawford, N.M., and Tsay, Y.F.** (1996). CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell* **8**, 2183-2191.

**Huang, N.C., Liu, K.H., Lo, H.J., and Tsay, Y.F.** (1999). Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* **11**, 1381–1392.

**Hu, H.C., Wang, Y.Y., and Tsay, Y.F.** (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J* **57**, 264–278

**Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., and Kudla, J.** (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* **134**, 3-58.

**Li, L., Kim, B.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., and Luan, S.** (2006). A  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway regulates a  $\text{K}^+$  channel for low-K response in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12625–12630.

**Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N.M., Siddiqi, M.Y., and Glass, A.D.** (2007). Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol.* **143**, 425–433.

**Little, D.Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A., and Malamy, J.E.** (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13693–13698.

**Liu, K.H., Huang, C.Y., and Tsay, Y.F.** (1999). CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**, 865–874.

**Liu, K.H., and Tsay, Y.F.** (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* **22**, 1005–1013.

**Qiu, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K. (2002).**

Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 8436-8441.

**Quintero, F.J., Martinez-Atienza, J., Villalta, I., Jiang, X., Kim, W.Y., Ali, Z., Fujii,**

**H., Mendoza, I., Yun, D.J., Zhu, J.K., and Pard,o J.M. (2011).** Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci* **108**, 2611-2616.

**Redinbaugh, M.G., and Campbell, W.H. (1991).** Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiol. Plant.* **82**, 640–650

**Newstead, S., Drew D., Cameron A.D., Postis, V.G., Xia, X., Fowler, P.W, Ingram, . C., Carpenter, E. P., Sansom, M. S., McPherson, M.J., Baldwin S. A., and Iwata, S. (2011).** Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian ogopeptide–poton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO J* **30**, 417-426.

**Tsay, Y.F., Ho C.H., Chen H.Y., and Lin S.H. (2011).** Integration of Nitrogen and Potassium Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol* **62**, 207-226.

**Tsay, Y.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., and Crawford, N.M. (1993).** The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705–713.

**Tsou P.L., Lee S.Y., Allen NS, Winter-Sederoff H., and Robertson D.** (2012). An ER-targeted calcium-binding peptide confers salt and drought tolerance mediated by CIPK6 in Arabidopsis. *Planta* 235, 539-552.

**Walch-Liu, P., Filleur, S., Gan, Y., and Forde, B.G.** (2005). Signaling mechanisms integrating root and shoot responses to changes in the nitrogen supply. *Photosynth. Res.* **83**, 239–250.

**Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., and Wu, W.H.** (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* **125**, 1347–1360.

**Zhang, H., and Forde, B.G.** (1998). An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407–409.